UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1961 - 1962 N° 823

Contribution à l'étude du

CLITOCYBE GIGANTEA

(Fries ex Sowerby) Gillet

et de ses

PRINCIPES ANTIBIOTIQUES

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 31 OCTOBRE 1962
devant la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

(Mention : Pharmacie)

par

Jean-Claude RINGENBACH

Pharmacien
Diplômé d'Études Spéciales de Biochimie
Diplômé de Sérologie

Examinateurs de la thèse

MM. P. DUQUÉNOIS, Professeur, Président
P. CORDIER, Professeur, } *Juges*
R. SARTORY, Professeur, }

IMPRIMERIE « ALSATIA » - MULHOUSE
1962

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1961 - 1962 N° 823

Contribution à l'étude du

CLITOCYBE GIGANTEA

(Fries ex Sowerby) Gillet

et de ses

PRINCIPES ANTIBIOTIQUES

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le.....
devant la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

(Mention : Pharmacie)

par

Jean-Claude RINGENBACH

Pharmacien
Diplômé d'Études Spéciales de Biochimie
Diplômé de Sérologie

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Examinateurs de la thèse

MM. P. DUQUÉNOIS, Professeur, Président
P. CORDIER, Professeur, } *Juges*
R. SARTORY, Professeur, }

IMPRIMERIE « ALSATIA » - MULHOUSE
1962

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548001_0027

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

- Administration -

MM. GAZET DU CHATELIER, Doyen
SCHREIBER, Assesseur
CLADY, Secrétaire

- Professeurs -

MM.	C. LAPP	Physique
	SARTORY	Bactériologie
	CORDIER	Pharmacie chimique
	DUQUÉNOIS	Matière médicale
	JAEGER	Botanique
	GAZET DU CHATELIER	Pharmacie galénique
	HASSELMANN	Chimie analytique
	SCHREIBER	Chimie organique
	EBEL	Chimie biologique

- Maîtres de conférences -

MM.	LEDOUX	Sciences naturelles
	MÉTAIS	Sciences appliquées
	MALGRAS[1]	Sciences naturelles
	LAUSTRIAT	Sciences physico-chimiques

- Maître de conférences honoraire -

M. COLLARD

- Cours complémentaires -

MM.	C. LAPP	Acoustique
	SARTORY	Cryptogamie
	CORDIER	Éléments de Chimie organique
	DUQUÉNOIS	Hydrologie
	GAZET DU CHATELIER	Pharmacodynamie
	HASSELMANN	Chimie minérale
	SCHREIBER	Chimie générale
	EBEL	Biochimie anal. et séméiologique
	LAVIGNE	Législation et Déontologie
	LEDOUX	Bactériologie pharm. et technique
	MALGRAS	Sérologie
	LAUSTRIAT	Minéralogie et Éléments de mathématiques
	MEYER	Comptabilité et Fiscalité

- Chefs de travaux pratiques -

Mme	KRISTENSEN	Chimie pharmaceutique
MM.	MATHIS	Chimie
	CARBIENER	Histoire naturelle
	STAHL	Bactériologie et Parasitologie
	C. F. LAPP	Chimie et Physique
	ROMOND	Bactériologie

A MON MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

Monsieur le Professeur Pierre DUQUENOIS
Professeur de Matière Médicale

Membre Correspondant National
de l'Académie de Médecine

Ancien Doyen de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
Chevalier de la Légion d'Honneur

Hommage de profonde gratitude
et de respectueux attachement

AUX MEMBRES DE MON JURY

Monsieur le Professeur René SARTORY
Professeur de Microbiologie et de Cryptogamie
A la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
Officier de la Légion d'Honneur

Monsieur le Professeur Paul CORDIER
Professeur de Pharmacie Chimique
A la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
Inspecteur Principal des Pharmacies
Chevalier de la Légion d'Honneur

Témoignage de sincère reconnaissance

A LA MÉMOIRE DE MON MAITRE DE STAGE ET PRÉDÉCESSEUR

Henri NEUKIRCH
Pharmacien
Docteur es Sciences

Il m'a inculqué les connaissances de base de la Pharmacie et l'amour de ma profession. En profonde reconnaissance pour la confiance qu'il m'a témoignée en me chargeant de lui succéder à la tête de sa Pharmacie dont il fut le titulaire de 1904 à 1955.

A MES PARENTS

En témoignage de ma profonde reconnaissance

A MA FEMME

ET A MES ENFANTS : Jean-Luc et Bertrand

Avec toute mon affection

A TOUTE MA FAMILLE

A MES AMIS

je dédie ce travail.

AVANT-PROPOS

Dans trois notes à l'Académie des Sciences en 1945, 1947, et 1949, A CH. HOLLANDE, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Montpellier, a attiré l'attention sur la présence d'un puissant antibiotique dans le *Clitocybe gigantea* (Fries ex Sowerby) Gillet, champignon Basidiomycète de la famille des Agaricacées. Sur un grand nombre de *microbes Gram positif* et *Gram négatif,* l'auteur a mis en évidence l'activité antibiotique de cette substance, à laquelle il a donné le nom de clitocybine. Il a, en particulier, signalé l'action à la fois bactériostatique et bactétiolytique de la clitocybine sur le *Bacille tuberculeux.*

Dans sa thèse de Doctorat en Pharmacie de l'Université de Montpellier, soutenue en 1949, A. F. RÉBERT a étudié la localisation de la clitocybine dans les différentes parties du carpophore du *Clitocybe gigantea* récolté dans la nature. Cet auteur a montré que les lamelles et les spores du chapeau étaient les éléments les plus actifs et il a effectué un certain nombre d'essais et de titrages microbiologiques à l'aide d'extraits éthérés de champignon sec et pulvérisé.

Après avoir pris part jusqu'en 1947 avec RÉBERT aux recherches de HOLLANDE, CH. RIVIÈRE continua pendant un certain temps, avec d'autres collaborateurs, l'étude des principes antibiotiques du *Clitocybe.* Ces auteurs n'ont malheureusement pu extraire de principe actif à l'état pur et débarrassé des pigments et des impuretés toxiques. Le travail fut suspendu à la suite de la mise à la retraite du Professeur HOLLANDE.

En 1955, Monsieur le Professeur P. DUQUÉNOIS nous suggéra de reprendre l'étude du sujet et nous a mis en relation avec A. F. RÉBERT, Docteur en Pharmacie, ancien élève de HOLLANDE, qui nous accueillit en toute amitié dans son

Laboratoire d'Analyses à Guebwiller. C'est à cet endroit que fut réalisé une grande partie de ce travail, et qu'il me soit permis de remercier ici tout particulièrement notre confrère A. F. RÉBERT pour sa précieuse collaboration tout au long de nos recherches.

Nous adressons nos sincères remerciements à Monsieur le Professeur A. CH. HOLLANDE pour l'aide avertie dont il a bien voulu nous honorer lors de l'élaboration de cette thèse.

Monsieur le Professeur J. P. EBEL a bien voulu mettre à notre disposition l'appareil à lyophilisation du Laboratoire de Chimie Biologique, nous lui en sommes très reconnaissants.

Nous remercions également Madame M. HAAG BERRURIER, Attachée de Recherches au C. N. R. S. qui nous a fait profiter de son expérience pour certaines questions techniques.

Avant d'aborder notre sujet, nous nous devons d'exprimer notre profonde gratitude aux membres de notre jury :

Monsieur le Professeur P. DUQUÉNOIS qui n'a cessé de nous prodiguer son aide par ses conseils éclairés et son dévouement inépuisable et qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

Messieurs les Professeurs R. SARTORY et P. CORDIER qui nous ont toujours honoré de leur bienveillant intérêt et qui ont bien voulu prendre notre thèse en considération.

L'objet de ce travail était de reprendre à la base les recherches de nos prédécesseurs afin de faire progresser le problème de la clitocybine.

Notre but initial était d'obtenir sur place au laboratoire, à n'importe quel moment de l'année, du mycélium de culture en quantité suffisante et d'isoler la clitocybine à l'état de pureté afin d'en faire l'étude chimique et biologique. Ce n'est qu'au cours de nos recherches que l'extrême labilité de la clitocybine acide nous a amené à émettre l'hypothèse qu'elle devait exister sous une forme combinée dans les cellules vivantes. Dès lors, notre but essentiel était d'isoler ce précurseur, d'étudier ses propriétés et de les comparer avec les propriétés de la clitocybine.

Au cours de notre exposé qui comprend six chapitres, nous avons essayé de donner un aperçu aussi complet que possible de l'état actuel de nos connaissances relatives à l'étude du *Clitocybe gigantea,* et ceci, afin de faciliter des recherches ultérieures sur la question. Voici le plan que nous avons adopté :

Chapitre premier

Les antibiotiques des Champignons Supérieurs.

— Extension de la notion d'antibiotiques.
— Les principales espèces testées, sur champignons spontanés, puis sur champignons cultivés.
— Nature chimique des principes isolés des Champignons Supérieurs.
— Intérêt biologique de ces antibiotiques et conditions d'application à la médecine.

Chapitre ii

Étude mycologique de l'espèce Clitocybe gigantea.

— Rappel de la classification des champignons et place de cette espèce dans la systématique.
— Description du Genre *Clitocybe* et de ses espèces.
— Description de l'espèce *Clitocybe gigantea* et de sa forme *candida.*
— Description des champignons que l'on peut confondre avec le *Clitocybe gigantea,* et leurs caractères mycologiques distinctifs.

Chapitre iii

Culture au laboratoire du mycélium de sporée du Clitocybe gigantea.

— Récolte et conservation des carpophores.
— Isolement et contrôle mycologique des spores.
— Mise en culture des spores et sélection des mycéliums.
— Repiquage des colonies de mycélium sur milieux spéciaux d'après la méthode de Hollande.
— Amélioration de cette technique de culture et mise au point d'une nouvelle méthode sur billes de verre.

— Observations concernant les conditions de culture; production d'acide cyanhydrique par le mycélium.

Chapitre iv

Extraction des principes actifs du mycélium de culture.

— Extraction de la clitocybine de Hollande selon le procédé de son auteur.
— Nouvelles données sur l'extraction des principes actifs.
— Élaboration d'une méthode personnelle avec isolement d'une nouvelle substance : la proclitocybine.

Chapitre v

Propriétés physico-chimiques des principes actifs.

— Rappel des propriétés de la clitocybine de Hollande.
— Nouvelles observations chimiques sur la clitocybine.
— Stabilité de la clitocybine.
— Propriétés de la proclitocybine, son hydrolyse en aglucone et en pentose.
— Réactions colorées, et essai de dosage de ces principes par voie chimique.
— Essais de stabilisation de la proclitocybine.

Chapitre vi

Propriétés biologiques des principes isolés du Clitocybe gigantea.

— Activité antibiotique *in vitro* de la clitocybine de Hollande.
— Activité antibiotique *in vitro* de la proclitocybine
— Toxicité et activité *in vivo* de la clitocybine
— Toxicité et activité *in vivo* de la proclitocybine
— Action de la proclitocybine sur la *croissance somatique* et les *tumeurs colchiciniques* du blé.

Enfin, dans la conclusion, nous voudrions dégager de notre exposé les principaux résultats auxquels nous sommes parvenus en nous rappelant cette phrase du grand physiologiste CLAUDE BERNARD : « L'esprit vraiment scientifique devrait nous rendre modestes et bienveillants. Nous savons tous bien peu de choses en réalité, et nous sommes très faillibles en face des difficultés immenses que nous offre l'investigation des phénomènes naturels. »

Chapitre premier

LES ANTIBIOTIQUES DES CHAMPIGNONS SUPÉRIEURS

A. — Extension de la Notion d'Antibiotique

Les antibiotiques utilisés actuellement en thérapeutique, la pénicilline, l'auréomycine, la streptomycine, la terrafungine, la chloromycétine, la spiramycine, la framycétine, la mycostatine, la tétracycline, la carbomycine, la novobiocine, la néomycine, l'érythromycine, la trichomycine, l'oléandomycine, la D-cyclosérine sont produits par des champignons inférieurs et des actinomycétales ou des bactéries, ceci est le cas pour la tyrothricine, la bacitracine et la colimycine. D'après la définition de WAKSMAN (58, 59) le terme « antibiotique » était réservé aux principes d'origine microbienne, et par extension, aux substances antibiotiques isolées des champignons inférieurs et préparés ensuite par synthèse. En réalité, le terme doit s'étendre aux substances d'origine biologique, susceptibles de provoquer des perturbations spécifiques dans le métabolisme normal des micro-organismes, même si elles sont fournies par des champignons supérieurs, des algues, des lichens, des phanérogames, comme l'a proposé DUQUÉNOIS (22, 23, 24). L'universalité des substances antibiotiques dans le règne végétal est de plus en plus admise, et n'est limitée que par l'insuffisance de nos expérimentations. On peut s'attendre à ce qu'un tiers des espèces végétales inhibe la croissance d'au moins l'un des germes testés, et qu'un cinquième des espèces possède une action stimulante sur la croissance des micro-organismes (travaux de MADSEN et PATES).

B. — Principales espèces testées

L'obstacle majeur à la recherche des substances antibioti-

ques sécrétées par les Champignons supérieurs est leur croissance très lente lorsqu'on les cultive au laboratoire. Il faut plusieurs semaines et parfois plusieurs mois pour que le Champignon atteigne son développement maximum. Aussi, les premières recherches dans ce domaine ont-elles porté sur les carpophores de champignons récoltés dans la nature. Le premier antibiotique extrait d'un champignon supérieur, a été la clitocybine de HOLLANDE obtenue en 1945 à partir d'une Agaricinée, le *Clitocybe gigantea,* à la suite d'observations initiales dans la nature. Ce champignon apparaît dans la première quinzaine de septembre sur les prairies alpestres de 800 à 1.800 m. d'altitude. Il forme des « ronds de sorcières » qui présentent une curieuse particularité : l'herbe morte qui jonche des emplacements stériles ne se putréfie pas et reste peu altérée d'une année à l'autre. La mort des herbes et leur conservation indiquent que la terre sous-jacente est pauvre en microbes responsables de transformations humiques et de putréfaction. Il semble donc que les excrétions mycéliennes du *Clitocybe* contiennent un produit antagoniste de la multiplication microbienne. RÉBERT (45) a étudié, sous la direction du Professeur HOLLANDE, l'activité antibiotique sur divers microorganismes *in vitro* et *in vivo;* ses extraits aqueux et éthérés furent obtenus à partir du mycélium, de pied, de chapeau et de lamelles du champignon récolté aux environs de Gresse dans l'Isère. Les lamelles et les spores du chapeau se révélèrent les organes les plus actifs sur le *Staphylococcus aureus* et le *Mycobacterium tuberculosis;* la mise au point de la culture du mycélium à partir de la spore a permis au Professeur HOLLANDE d'isoler la clitocybine acide, produit très actif mais très labile. Nous avons repris ce travail en collaboration avec RÉBERT et nous nous proposons de démontrer que la clitocybine acide de Hollande existe en réalité dans la cellule vivante sous une forme combinée que nous avons appelée la proclitocybine.

Ces dernières années, de nombreuses investigations ont considérablement étendu le domaine des propriétés antibiotiques des Champignons supérieurs. Dès septembre 1946 RÉBERT (Travail inédit) a soumis une trentaine d'espèces, récoltées das la vallée de Guebwiller, dans le Haut-Rhin, à des

essais sur *Staphylococcus aureus*, (Souche d'Oxford fournie par l'Institut Pasteur), d'après la technique d'Heatley. Nous résumons dans un tableau les résultats de ses essais.

Champignons examinés — *Diamètre de l'auréole en cm.*

Familles	Espèces	Extrait brut au 1/10	Extrait brut au 1/2
Pezizacées	*Peziza divers*	1,3	1,6
Morchellacées	*Morchella vulgaris*	3	—
Cantharellacées	*Craterellus cornucopioïdes*	1,6	3,5
Clavariacées	*Clavaria bothrytis*	1,7	3,5
Hydnacées	*Hydnum repandum*	1,4	2
Popyporacées	*Polyporus fomentarius*	1	1
Bolétacées	*Boletus edulis*	1	1
	Boletus glutinosus	1	1
	Boletus aurantiacus	1	1
	Boletus satanas	1	1
Russulacées	*Lactarius piperitus*	1,5	—
	Russula emetica	1,5	1,5
	Russula cyanoxanta	1	3
	Russula alutacea	1	1
Agaricacées	*Amanita vaginata*	1,5	1,8
	Amanita pantherina	1,5	1,4
	Tricholoma tigrinum	1	1,6
	Clitocybe laccata	1,5	—
	Clitocybe candida (var. jeune du Clitocybe gigantea)	2,4	3,2
	Psalliota campestris	1,2	—
	Lepiota procera	1	1
	Pholiota squarrosa	1,6	—
	Pholiota mutabilis	1,2	2,3
Lycoperdacées	*Lycoperdon pyriforme*	1,7	1,9
	Bovista plumbea	1	—
Sclerodermatacées	*Pisolithus crassipes*	1	1

Ces essais montrent une activité antibiotique nette sur le *Staphylococcus aureus* de : *Morchella vulgaris, Craterellus cornucopioïdes, Hydnum repandum, Amanita vaginata, Clitocybe candida* (forme jeune de Clitocybe gigantea de Hollande), *Russula cyanoxanta, Pholiota mutabilis* et *Lycoperdon pyriforme.* Les essais comparatifs que nous avons effectués depuis n'ont pas donné des résultats superposables. C'est ainsi que certains Bolets se sont montrés actifs sur le *Staphylococcus aureus* les années suivantes. Il y a donc lieu de tenir compte dans ces recherches des conditions météorologiques variables d'une année à l'autre et peut-être des conditions édaphiques.

ODDOUX (41, 42) s'est servi d'une méthode originale de culture qui accélère la libération des produits du métabolisme. Il a testé 488 souches d'Homobasidiomycètes représentant 451 espèces différentes (dont 365 Agaricales). Il a cherché leur activité antibiotique vis-à-vis d'une Bactérie Gram positive *(Micrococcus pyogenes var. aureus)* et d'une bactérie Gram négative *(Escherichia coli).* Les champignons actifs appartiennent aux genres les plus variés; 18% des souches examinées sont actives sur au moins l'une des deux Bactéries pathogènes. Parmi les souches actives, 60% ne sont actives que sur le *Micrococcus pyogenes, var. aureus,* 35% sur les deux bactéries et 5% uniquement sur l'*Escherichia coli.* Selon ODDOUX les genres *Marasmius, Mycena, Clitocybe, Rhodophyllus* sont particulièrement riches en espèces antibiotiques; d'autres genres, par contre, ne renferment aucune espèce active : les *Hygrophorus, Melanoleuca, Naucoria, Galera, Panaedus* et *Lactarius.* De nombreuses espèces se sont révélées antibiotiques, ce sont : *Inoloma traganum, Leptoporus borealis, Leptoporus spumeus, Trametes serialis, Trametes unicolor, Fomes officinalis, Lenzites saepiaria, Corticium vellereum.* Au cours de ses recherches ODDOUX a fait l'observation suivante : Les Champignons supérieurs doués de pouvoir antibactérien sont en grande majorité des espèces lignicoles (toutes les Aphyllophorales par exemple), souvent aussi des espèces foliicoles (*Clitocybe hydrogramma, Clitocybe odaro, Marasmius confluens, Marasmius peronatus* . . .) ou humicoles *(Clito-*

cybe brumalis, Clitocybe nebularis, Clitocybe splendens, Paxillus involutus, Collybia butyracea . . .). Mais on n'en trouve que rarement parmi les Champignons mycorhiziques : leur action est alors faible et limitée souvent aux Bactéries Gram-positives. Ainsi sur huit espèces de *Lycoperdon* testées par ODDOUX, la seule qui inhibe la croissance des Bactéries est le *Lycoperdon pyriforme,* la seule espèce de ce genre qui soit lignicole. Il est à noter ici que RÉBERT (Travail inédit) avait également trouvé lors de ses investigations une activité antibiotique sur *Staphylococcus aureus* chez *Lycoperdon pyriforme.*

C. — **Nature chimique des principes isolés**

La constitution chimique des antibiotiques des Champignons supérieurs reste encore très peu connue dans la plupart des cas. Les antibiotiques sécrétés par les mycéliums sont de constitution très variée. Ils peuvent être labiles ou stables à la température ordinaire. Le fait le plus marquant est l'isolement chez les Homobasidiomycètes par les écoles américaines et scandinaves d'acides polyacétyléniques, dont on ne soupçonnait guère la dispersion dans la nature. BU'LOCK (18, 19) a isolé du *Polyporus anthracophilus* deux antibiotiques polyacétyléniques, le matricarianol et un ester apparenté à cet alcool (18). Le matricarianol est le trans-trans 2,8 décadiène-4,6 diyne -I-ol; l'ester est le trans-trans-2,9 décadiène-4,6 diynoate de méthyle. ROBBINS et ses collaborateurs (52) ont extrait du *Polyporus biformis* les biformyne 1 et 2, également de structure polyacétylénique. La biformyne I est très active sur l'*Escherichia coli, le Staphylococcus aureus,* et le *Klebsiella pneumoniae.* Le Clitocybe diatreta fournit la diatrétyne, composé diacétylénique en C_8 qui a pu être obtenu cristallisé. ANCHEL (2, 4) attribue l'activité antibiotique de ce champignon à un nitrile polyacétylénique qui par hydratation diastasique donnerait une amide inactive. C'est le premier exemple d'un nitrile polyacétylénique dans la nature. L'agrocybine fournie par l'*Agrocybe dura* est de formule voisine. On l'a obtenue cristallisée sous forme d'amide triacétylénique en C_8

qui semble préexister dans le liquide de culture sous une forme liée (3). BU'LOCK et LEADBEATER (19) pensent que les Basidiomycètes synthétisent les composés polyacétyléniques à partir du glucose. La dégradation du glucose se fait par deux voies distinctes : en présence d'infusion de blé, elle donne peu de composés polyacétyléniques; en l'absence des facteurs de croissance apportés par l'infusion de blé, une quantité plus grande du glucose consommé est convertie en polyacétylènes. On peut donc admettre qu'un intermédiaire dans la dégradation normale du glucose se décompose suivant deux voies, l'une étant le métabolisme normal, l'autre aboutissant à la formation des composés polyacétyléniques.

Le *Clitocybe nebularis* fournit la nébularine (38, 39) caractérisée par un spectre antibactérien très sélectif sur les Mycobactéries. Elle possède une activité encore prononcée sur le *Mycobactérium tuberculosis* à une dilution de 1/3.000.000. Elle est inactive sur les Staphylocoques, les Streptocoques, les Colibacilles et sur tous les germes autres que ceux du genre Mycobactérium. Elle est très toxique. La nébularine, hétéroside appartenant au groupe des purines, est la 9-(ß D-ribosyl) purine.

L'acide polyporique du *Polyporus rutilans* (28) l'atromentine du *Paxillus atrimentosus,* la pleurotine du *Pleurotus griseus,* la lactarovioline du *Lactarius deliciosus,* le boletol de plusieurs espèces de *Boletus* sont des substances antibiotiques appartenant au groupe des pigments (34). La psalliotine extraite du *Psalliota xanthoderma* est une substance extrêmement sensible à la lumière blanche (9, 10, 11). Il faut travailler en chambre noire ou en lumière jaune pour l'extraire du champignon. Des chercheurs Tchècoslovaques HEJTMANKOVA et MARTINEC ont isolé en 1956 du *Pleurotus mutilus* un antibiotique soluble dans l'eau, très stable à la lumière, résistant aux variations de température. Il est très actif contre le *Staphylococcus aureus.* Le sérum humain ne l'inactive pas et elle ne paraît pas toxique. Sa constitution chimique est actuellement à l'étude.

D. — **Intérêt biologique et conditions d'application**

Les antibiotiques des Champignons supérieurs ne sont pas encore sortis du domaine expérimental et parmi tous ces composés aucun n'a trouvé d'utilisation jusqu'à ce jour dans la lutte contre les maladies de l'homme, des animaux et des plantes cultivées. La définition même du terme antibiotique n'implique nullement l'existence d'une activité antibiotique applicable à la médecine. Quelques produits seulement sont employés en chimiothérapie, malgré le grand nombre de ces substances décrites et isolées d'espèces appartenant à tous les embranchements du règne végétal. En effet un antibiotique doit posséder diverses propriétés additionnelles pour devenir un agent chimiothérapique :

— Spectre étendu d'activité anti-microbienne ou action hautement sélective sur un germe.
— Absorption rapide et diffusion efficace dans l'organisme.
— Stabilité en présence des constituants chimiques des humeurs.
— Toxicité sélective pour le micro-organisme parasite et non-toxicité pour l'hôte infecté.
— Élimination lente, mais totale avec absence d'accumulation.

Les antibiotiques qui ne répondent pas à ces conditions, ne trouvent pas d'emploi actuel en thérapeutique. Ils présentent néanmoins un intérêt biologique et scientifique considérable. Leur étude est susceptible d'éclairer dans une large mesure nos connaissances encore rudimentaires du mode d'action de ces principes et par là, d'ouvrir la voie à la synthèse d'agents chimiothérapiques nouveaux. Des modifications de structure pourraient en faire de puissants médicaments. Dans les recherches actuelles, en particulier dans le domaine des Champignons supérieurs, des substances intéressantes sont fréquemment écartées par suite de la présence d'impuretés toxiques. Des produits d'origine biologique à très haute activité pharmacodynamiques pourraient ainsi encore être découvertes et trouver utilisation en dehors de la chimiothérapie des infections.

Chapitre II

ETUDE MYCOLOGIQUE DE L'ESPÈCE CLITOCYBE GIGANTEA PLACE DANS LA SYSTÉMATIQUE

A. — Rappel schématique de la classification des champignons

Le *Clitocybe gigantea* dont les importantes propriétés antibiotiques font l'objet de notre travail, est un Champignon homobasidié, appartenant au genre *Clitocybe* (Agaricacées).

Pour situer la famille des Agaricacées, le Genre *Clitocybe* et l'espèce *Clitocybe gigantea* dans la systématique, nous rappellerons brièvement la définition et la classification des Champignons.

Les Champignons sont des Thallophytes sans chlorophylle, les Thallophytes, étant des végétaux inférieurs sans feuilles, racines ni fleurs. Ils sont habituellement répartis en cinq grands groupes :

1. les Myxomycètes
2. les Phycomycètes
3. les Ascomycètes
4. *les Basidiomycètes*
5. les Fungi imperfecti

Le groupe des Basidiomycètes, dont fait partie la famille des Agaricacées se subdivise à son tour en Hétérobasidiomycètes et en Homobasidiomycètes. Les Homobasidiomycètes forment deux sous-groupes qui sont les Hétérobasidiès et les Homobasidiés. Le sous-groupe des Homobasidiés comprend trois séries:

1. les Gymnocarpes
2. *les Hémiangiocarpes*
3. les Angiocarpes

Les Hémiangiocarpes sont répartis en six familles :

1. les Bolétacées

2. les Gomphidiacées
3. les Paxillacées
4. les Hygrophoracées
5. les Russulacées
6. *les Agaricacées*

Les *Agaricacées,* famille la plus importante des Hémiangiocarpes, sont classées d'après Patouillard* en quatre séries et en onze tribus :

Série I 1) les Amanitées
2) les Lépiotées
3) les Volvariées
4) les Agaricées
Série 2 5) les Coprinées
6) les Strophariées
7) les Pholiotées
8) les Cortinariées
Série 3 9) les Entolomées
10) les Collybiées
Série 4 11) les *Tricholomées*
12) les Pleurotées

La tribu des Tricholomées comprend des champignons en général assez robustes et trapus, à chapeau et pied confluents et sensiblement de même consistance. Voile général presque toujours fugace. Voile partiel rarement développé. Lamelles sinuées, émarginées, adnées ou décurrentes. Spores blanches ou peu colorées, de petite taille lisses ou verruqueuses, sans pore germinatif; cystides en général nulles. Elle peut être divisée en trois sous-tribus :

1) *Les Tricholomées* à lamelles adnées-émarginées et spores blanches en masse : Genre *Armillaria, Tricholoma, Lyophyllum* et *Melanoleuca.*

2) *Les Clitocybinées* à chapeau déprimé ou en entonnoir, lamelles décurrentes et spores blanches : Genres *Armilareilla, Clitocybe, Lepista, Leucopaxillus* et *Laccaria.*

---

* PATOUILLARD N. Essais taxonomique sur les Basidiomycètes — Lons-le-Saunier 1900.

3) *Les Orcellinées* à lamelles émarginées ou décurrentes et spores colorées en masse (rose ou rose-jaunâtre), ornementées ou lisses : genres *Rhodocybe, Rhodopaxillus, Clitopilopsis* et *Clitopilus.*

B. — **Description du genre clitocybe**

Le Genre Clitocybe, de *la sous-tribu des Clitocybinées,* réunit des champignons à chapeau plus ou moins charnu, souvent en entonnoir, à lamelles décurrentes, à basides non colorables ou carmin acétique et à spores blanches, lisses, ou amyloïdes (sauf dans la section *Aspropaxillus* et le *C. cyathiformis).* On peut les regarder comme des Tricholomes à lamelles décurrentes et spores blanches : Genres *Armilariella,* à la conception des anciens mycologues; en sont en effet exclus les espèces à spores ornementées *(Lepista, Leucopaxillus* et *Laccaria)* et le groupe des Difformes de Fries. Ainsi compris, le genre *Clitocybe* renferme un grand nombre d'espèces, le plupart comestibles (quelques-unes cependant toxiques), qu'on peut classer comme suit :

A. *Sous-genre Eu-Clitocybe Konr. et Maubl.* Champignon à chapeau généralement assez épais et charnu, à chair non hygrophane. Plusieurs sections :

I. *Candicantes (Quél.)* Champignons blancs ou blanchâtres, à chapeau charnu, régulier, convexe-plan, puis déprimé; lamelles adnées-décurrentes. Ex. : *Clitocybe candicans* (Fr. ex Pers)) Quél. : *rivulosa* et sous-espèce *dealbata, cerussata* (Fr.) Quél. : *phyllophila* (Fr.) Quél.

2. *Infundibuliformes Fr.* Chapeau en entonnoir, épais au centre, ocracé ou roux; lamelles longuement décurrentes. Ex. : *Clitocybe infundibuliformis, geotropa* et *Alexandri* (Gill.) Konr.

3. *Aspropaxillus Kühner et Maire,* champignons robustes, charnus, pâles à lamelles à peine décurrentes et spores amyloïdes. Ex. : *Clitocybe gigantea* (Fr. ex Sow.)

4. *Disciformes* (Fr.) Chapeau charnu, plan ou peu déprimé gris ou vert, non hygrophane. Lamelles adnées, puis un peu décurrentes. Ex. : *Clitocybe nebularis, Clitocybe clavipes* (Fr. ex Pres.), *Clitocybe odora.*

5. *Oleariae (Maublanc).* Champignons lignicoles, en touffes, à chapeau charnu et lamelles décurrentes. : *Clitocybe Olearia, Clitocybe tabescens* (Fr. ex Scop) Bres.
Le genre *Armillariella* pourrait être rattaché à cette section comme forme pourvue d'un anneau.

6. *Hygrophoropsis (Schroet.) R. Maire,* champignons peu charnus, en entonnoir, de teinte pâle ou vive, bien caractérisés par leurs lamelles dichotomes bifurquées et souvent réunis aux *Cantharellus.* Ex. : *Clitocybe aurantiaca; Clitocybe umbonata* (Fr. ex Pers.) Konr.

B. *Sous-genre Hygrophanes* Quél. Champignons à chapeau moins charnu que les précédents, généralement gris ou brun, pâlissant et à chair hygrophane. Ils rappellent les *Collybia tephrophanae,* dont ils se distinguent par leurs basides non colorables par le carmin acétique. Les espèces, assez nombreuses, sont d'une détermination précise difficile, étant souvent très voisines et ayant été diversement interprétées. Ce sont des comestibles de peu de valeur.

C. *Sous-genre Cyathiformes* Fr. Chapeau peu charnu, gris ou brun, presque membraneux, en coupe; lamelles nettement décurrentes. Ex. : *Clitocybe cyathiformis, brumalis* (Fr.) Quél., *Clitocybe suaveolens* (Fr. ex Schum.) Quél., etc.

D. *Sous-genre Orbiformes* Fr. Chapeau peu charnu, convexe plan ou déprimé; lamelles adnées ou décurrentes par une dent. Ex. : *Clitocybe orbiformis* (Fr.) Quél., *ditopoda* (Fr.) Gill . . .

La place de l'*espèce Clitocybe gigantea* dans la systématique peut donc être résumée ainsi : Végétal du *Sous-règne* des Métaphytes, *Embranchement* des Tallophytes, *Sous-embranchement* des Champignons, *Groupe* des Homobasidiomycètes, *Sous-groupe* des Homobasidiés, *Série* des Hémiangiocarpes, *Famille* des Agaricacées, *Tribu* des Tricholomées, *Sous-tribu* des Clitocybinées, *Genre* Clitocybe, *Sous-genre* Eu-Clitocybe, *Section* Aspropaxillus, *Espèce gigantea,* dénommée *candida* à l'état jeune (Fries ex Sowerby).

C. — Description de l'espèce Clitocybe gigantea (Fries ex Sowerby) Gillet

Les mycologues considèrent le *Clitocybe gigantea* et le *Clitocybe candida* tantôt comme deux espèces différentes (Brésadola et Singer), tantôt comme une seule et même espèce, le *Clitocybe candida* étant alors une variété du *Clitocybe gigantea (Heim.)* On admet actuellement que l'appellation *Clitocybe candida* n'est ni une espèce différente ni une variété du *Clitocybe gigantea*; elle désigne seulement la forme *jeune du Clitocybe gigantea* (Priane). Le nom de *Clitocybe candida* Brésadola doit être abandonné pour celui de *Clitocybe gigantea,* dont il est le synonyme. (Maublanc) *.

Les synonymes de *Clitocybe gigantea* sont *Paxillus giganteus* (Fries), *Aspropaxillus giganteus* (Kühner et Maire), *Aspropaxillus candidus* (Singer), et *Clitocybe candida* (Brésadola). De nombreux noms vulgaires désignent cette espèce : Clitocybe gigantesque, Clitocybe candide, Clitocybe blanc; « mousseron blanc » ou plus simplement le « blanc » ou le « gros blanc ».

La morphologie externe de cette espèce comprend les caractéristiques suivantes :

Chapeau : très charnu, d'abord convexe, non mamelonné, avec la marge enroulée et pubescente, à surface lisse et blanchâtre. A l'état jeune le chapeau est blanc de lait (forme *candida*); en se développant, il se déprime au centre et à la fin il est en entonnoir, et peut atteindre 30 à 40 cm de diamètre avec le bord ondulé, ridé et sillonné; il devient alors jaunâtre, couleur de cuir ou ocracé roussâtre; il se déchire en montrant des parties plus claires.

Pied : (8 cm de long, 2 à 5 cm de diamètre) gros, court, trapu, compact, plein, plus épais à la base; surface du pied rugueuse, parfois crevassée, de même couleur que le chapeau ou plus pâle.

Lamelles : inégales, minces, très serrées et peu larges. Pour la

---

* MAUBLANC A. — Les Champignons de France — Encycl. prat. nat., II Tomes, Lechevalier Paris 1952.

forme jeune elles descendent plus longuement sur le pied que pour la forme adulte; d'abord blanches, elles deviennent ensuite jaunâtre-roussâtre pâle; on peut les séparer facilement. *Chair* : ferme, blanc de lait chez les jeunes, devenant par la vieillesse molle, aqueuse et de couleur chamois. Elle possède une forte odeur de farine à l'état jeune, faible à l'état âgé et une saveur douce.

Sporée : en masse épaisse d'un blanc pur à l'état jeune, puis blanchâtre argilacé pâle; elle se colore en bleu violacé par le réactif iodé de Melzer (spores amyloïdes).

Spore : hyaline, ovoïde, lisse, amyloïde de 8μ x 4,5 - 5,5μ

Champignon comestible, médiocre, qui renferme un principe toxique détruit par la chaleur à 70^0 en même temps que le principe antibiotique.

Habitat du Clitocybe gigantea.

Il pousse dans les prés et non dans les bois, entre 600 et 1.800 m d'altitude de préférence dans les pâturages sur les versants inclinés, longuement exposés au soleil(contreforts du Vercors, Alpes-Maritimes, Jura Français et Suisse, Suède et Danemark).

Les carpophores apparaissent début septembre jusque vers le 15 octobre. Les sorties multiples des carpophores se manifestent en général les deux ou trois jours ensoleillés qui suivent une forte pluie. Ils déterminent dans les prés de larges cercles, appelés « ronds de sorcières ». Les Graminées et autres plantes (Scabieuse, Ombellifères) sont tuées par le champignon lors de son développement. Les carpophores apparaissent presque uniquement à la périphérie externe des ronds; ils se situent à la limite des plantes mortes et des plantes vivantes. Il ne reste de ces cercles que de légères traînées plus ou moins ondulées. Ces productions sont reconnaissables dans les prés — même en l'absence de champignons — par la présence de grandes plages d'herbes mortes qui donnent naissance à une couronne formée de taches stériles ayant 30 cm à 1 m, parfois même 3 m de largeur. Les plantes mortes, tuées par le Clitocybe, demeurent longtemps sans se putréfier; on peut constater

sous elles la présence d'un feutrage mycélien appartenant à de nombreuses moisissures saprophytes ou à des mycéliums de divers champignons basidiomycètes.

D. — **Champignons que l'on peut confondre avec le Clitocybe gigantea**

Plusieurs gros champignons qui ressemblent au *Clitocybe gigantea* peuvent donner lieu à des confusions lors de la récolte de celui-ci. Pour éviter toute erreur nous leur consacrons une courte description en insistant sur les principaux caractères qui permettent, d'après A. CH. HOLLANDE et G. MÉTROD (30), de les distinguer du Clitocybe gigantesque.

Clitocybe geotropa (Fries ex Bulliart) Quélet et sa forme maxima (J. Favre).

Synonymes : *Agaricus geotropus* (Bulliart).

Noms vulgaires : Clitocybe géotrope ou Bergère.

Chapeau : pourvu au centre d'un gros mamelon que persiste au fond lorsque le chapeau a pris, dans la vieillesse, la forme d'un entonnoir; il est de couleur jaune-ocracé.

Pied : plein, devient long de 7 à 10 cm, dur, fibreux, de même couleur que le chapeau. Pied moins trapu et plus long que le *Clitocybe gigantea.*

Chair : à odeur aromatique de coumarine ou de lavande, mais non de farine.

Spores : plus largement elliptiques, blanches mesurant 7,5μ x 5 à 6,5μ ne se colorant pas en bleu-violet par le réactif iodé de Melzer. Il croît sous le couvert de la forêt et dans les haies où il forme de grands cercles, plutôt que dans les prés. Son apparition est plus tardive. Le *Clitocybe geotropa* type diffère de sa forme *maxima* par sa taille plus petite comme la forme *candida* du *Clitocybe gigantea.*

Champignon comestible, dont la différence essentielle avec le *Clitocybe gigantea* est le non bleuissement de la sporée sous l'action du réactif iodé de Melzer, ce qui permet de différencier sûrement les deux espèces.

Leucopaxillus paradoxus *(Boursier).*

Synonymes : *Clitocybe paradoxa* (Constantin et Dufour); *Lepista paradoxa* (R. Maire).

Chapeau : charnu, dur, satiné, d'abord convexe à marge enroulée et pubescente, puis étalé et déprimé dans la vieillesse; au début blanc crème, puis chamois ou ocracé pâle; pellicule se craquelant à la fin; 8 à 10 centimètres de diamètre.

Pied : robuste, dur, plus ou moins long, plein, finement écailleux, blanchâtre, puis crème; un peu renflé et laineux à la base.

Lamelles : inégales, séparables, assez étroites, serrées, décurrentes, ramifiées et interveinées, blanches, puis crème.

Chair : épaisse, ferme, blanche, odeur de farine, saveur douce, quelque fois amère.

Sporée : blanche, bleuissant au réactif iodé de Melzer.

Spore : ovoïde, 7-8μ x 4-5μ; verruqueuse.

En cercles dans les pâturages et sous les Conifères en automne. Espèce rare, difficile à distinguer du *Clitocybe gigantea.* Le meilleur caractère différentiel résulte de l'examen des spores qui, colorées au réactif iodé de Melzer et vues au microscope, montrent de fines verrues bleu-noir.

Clitocybe alexandri *(Gillet) Konrad.*

Synonymes : *Clitocybe gilva* (Quélet); *Lepista alexandri* (Gillet); *Paxillus alexandri* (Fries); *Paxillus extenuatus* (Ricken).

Chapeau : très charnu, d'abord convexe à marge enroulée et pubescente; puis, étalé et déprimé; gris chamois ou bistré, 6 à 10 cm de diamètre.

Pied : court, robuste, plus pâle que le chapeau; base cotonneuse agglomérant les aiguilles.

Lamelles : inégales, serrées, étroites, décurrentes, souvent rameuses; d'abord crème, puis bistre pâle.

Chair : molle, spongieuse, bistre pâle, sans odeur de farine.

Sporée : blanche, ne bleuissant pas au réactif iodé.

En troupes dans les forêts de Conifères.

Cette espèce est bien reconnaissable à son port trapu, à sa consistance molle et à sa couleur gris bistre.

Russula delica (Fries).

Synonyme : *Agaricus chloroïdes* (Krombholz).

Noms vulgaires : Russule sans lait; Prévat; Colombine.

Chapeau : charnu, dur. convexe, puis déprimé, atteignant 10 à 12 cm de diamètre, à marge un peu enroulée; blanc de neige ou blanc crème, souvent sali par la terre qu'il soulève en se développant.

Pied : épais et court, dur, plein, blanc, souvent teinté de bleu verdâtre au sommet.

Lamelles : inégales, minces, espacées, descendant peu sur le pied; blanches à reflet verdoyant.

Chair : ferme, grumeleuse, même dans le pied, blanche, un peu âcre.

Sporée : blanche, bleuissant au réactif iodé de Melzer.

Spore : arrondie, 8-10μ x 7-9μ, verruqueuse.

Comestible, croît en automne dans les bois; sa chair grumeleuse, cassante, un peu âcre permet de distinguer le *Russula delica* du *Clitocybe gigantea* et de sa forme *candida.*

Un grand nombre d'autres espèces blanches, blanchâtres ou jaunâtres, se rencontrent dans les prés et les pâturages à la fin de l'été et en automne. Ces espèces sont si différentes par des caractères très marqués qu'il est facile de les distinguer du *Clitocybe gigantea.* Ce sont essentiellement les *Lepiota procera, Lepiota excoriata, Lepiota naucina* dont les *pieds sont pourvus d'un anneau.* Dans les mêmes stations croît en cercles l'*Agaricus campester* (Fries ex Linné), reconnaissable à l'anneau qui orne le pied, à ses lamelles rosées, puis bistre-pourpré, à sa chair parfumée et à sa sporée brun-pourpre. On y rencontre aussi les *Clitocybe rivulosa* et *dealbata,* petites espèces blanchâtres ne dépassant pas 6 cm, et vénéneuses.

Sur les bords et dans les clairières des bois on rencontre l'un des meilleurs champignons comestibles, le *Clitopilus prunulus,* à chapeau convexe puis déprimé, blanc ou gris-pâle, à lamelles serrées, minces, étroites, décurrentes, blanches puis roses, à odeur de farine et à sporée rose. Enfin, les bois renferment en abondance, au mois d'octobre, le *Clitocybe cerussata* dont le

chapeau mince vernissé, blanc, ne dépasse guère 7 cm. de diamètre. La forme *candida* du *Clitocybe,* par sa couleur blanc de lait peut avoir une ressemblance extérieure avec les grands lactaires blancs des bois : *Lactarius piperatus* et *Lactarius vellereus.* Les lactaires s'en distinguent par leur latex, leur âcreté et leur habitat sous le couvert de la forêt. On pourrait ajouter qu'il en est de même du *Lactarius controversus* qui se rencontre parfois dans les prés, à la lisière des bois, en automne, à la même époque que le *Clitocybe gigantea.*

Cette mise au point mycologique, en dehors de son intérêt systématique, est destinée à faciliter la récolte de l'espèce antibiotique en vue de sa culture au laboratoire.

Chapitre III

CULTURE AU LABORATOIRE DU MYCÉLIUM DE SPORÉE DU CLITOCYBE GIGANTEA

La récolte du Clitocybe gigantesque pour l'extraction des principes antibiotiques est très onéreuse; la dessiccation et la conservation des carpophores sont délicates. Cette récolte a cependant permis à RÉBERT d'étudier la localisation des principes antibiotiques dans les différentes parties du carpophore. RÉBERT (45) a prouvé que les lamelles de l'hyménium et les spores du chapeau étaient les éléments les plus riches en principes actifs. Pour étudier ces éléments il fallait de nombreux chapeaux et pour les obtenir des essais de culture en sous-sol avaient été entrepris sous la direction du Professeur HOLLANDE. Des meules, formées de terre et de paille d'avoine préalablement fermentée ont produit un mycélium abondant. Malheureusement elles ne formaient que des primordias se desséchant, sans évoluer en carpophores.

Des tentatives d'obtention des carpophores développés artificiellement à partir de meules en grottes ou en caves ayant échoué, le problème de production du mycélium au laboratoire a été envisagé. Nous avions la possibilité d'opérer par bouturage d'une portion prélevée soit du carpophore, soit de la germination des spores. L'hyménium et les spores étant, d'après RÉBERT, les parties les plus riches en principes actifs, la deuxième solution paraît la plus rationnelle. Il importe dès lors d'obtenir des spores non souillées des diverses moisissures (*Pénicillium, Mucor, Aspergillus,* etc . . .) répandues dans la nature et se développant plus rapidement que les spores des carpophores du *Clitocybe*. Sinon, ces moisissures envahissent les cultures. Il est donc indispensable, pour avoir de telles

spores, d'obtenir la formation des carpophores en dehors des prés.

A. — **Récolte et conservation des carpophores**

La présence des plages d'herbes mortes dans les prés permet de déterminer — en dehors de la sortie des carpophores — la localisation probable des Clitocybes. Les renseignements mycologiques indiqués au Chapitre II facilitent, au moment de la récolte, l'identification de l'espèce. Entre le 20 Août et le 15 septembre on prélève, peu avant l'apparition des carpophores et à la partie externe d'un « rond de sorcière », plusieurs cubes de terre, riches en mycélium, mesurant 40 cm de côtés. On dépose ces cubes dans une cave suffisamment humide et de température constante voisine de 16^0. En quelques jours les surfaces des blocs de terre se recouvrent peu à peu d'un épais mycélium blanc. Des primordias se développent dont quelques-uns seulement donnent des carpophores. Ils sont déformés et relativement plus petits que ceux qui produisent les « ronds de sorcière ».

On recueille aseptiquement ces carpophores et on les place dans des enveloppes de papier glacé et stérilisées au four Pasteur. On les transporte au laboratoire où il faut les utiliser dans les plus brefs délais. Une fois, desséchés, les carpophores se conservent mal et sont rapidement attaqués par une chenille micro-lépidoptère.

B. — **Isolement et contrôle mycologique des spores**

On dispose sur un papier noir glacé l'envers d'un chapeau de *Clitocybe*, séparé de son pied, et après 24 heures on obtient une poussière blanche de spores sur le papier. (Ce procédé donne des spores souillées de diverses moisissures, lorsque celles-là proviennent de carpophores prélevés dans la nature.)

Nous avons soumis ces spores à un contrôle supplémentaire avant de les mettre en culture. La forme des spores examinées au microscope, leur taille et surtout leur comportement envers le réactif de Melzer fournit des renseignements d'identité précieux. Elles sont hyalines, de forme ovoïde, de

structure lisse et mesurent 6,5μ x 4,5μ à 5,5μ; amyloïdes, elles sont colorables en bleu plus ou moins foncé par l'iode. Pour constater cette propriété on dépose la sporée sur un verre de montre et on ajoute une goutte de réactif de Melzer : elle se colore en gris-bleu.

FORMULE DU RÉACTIF DE MELZER :

Réactif I	Hydrate de Chloral pur	
Réactif II	Iodure de potassium	1,5 g
	Iode	0,5 g
	Eau distillée	20 ml

On mélange I et II à parties égales au moment de l'emploi.

Le genre *Clitocybe* est un genre à spores non amyloïdes, sauf deux espèces : *Cl. cyathiformis,* petit champignon d'un brun cendré, et *Cl. gigantea,* qui sont de la section *Aspropaxillus.* Cette réaction permet donc un contrôle d'identité précieux avant la mise en germination des spores, en vue de la culture.

C. — **Mise en culture des spores et sélection des Mycéliums**

La sporée, pure et contrôlée, du Clitocybe gigantea est mise en germination selon deux techniques indiquées par HOLLANDE (33).

PREMIÈRE TECHNIQUE SUR CAROTTE :

On dépose dans un gros tube de Roux, préalablement stérilisé au four Pasteur, une carotte saine; celle-ci a été coupée en croix à sa partie supérieure sur une hauteur de 3 à 4 cm de profondeur. On bouche au coton et on stérilise le tout à l'autoclave pendant vingt minutes à 115^0. On enlève aseptiquement le bouchon de coton que l'on remplace par une portion du chapeau du carpophore dont les spores ont été contrôlées au préalable (b), les lamelles étant dirigées vers le fond du tube. On recouvre d'un papier stérile froissé à sa partie inférieure le long du tube. On place les tubes ainsi préparés dans une armoire que l'on tient fermée. Après 12 heures, on enlève la portion du carpophore; on flambe l'ouverture du tube et on le bouche avec du coton stérile.

Au bout de cinq à six jours, se développe à la surface de la

carotte, surtout le long des parois internes verticales des fentes supérieures, un fin duvet mycélien blanc uniforme de 2 à 3 mm de haut. Bientôt la culture s'arrête, et semble se dessécher plus ou moins. Dans la suite, tardivement, apparaissent de petites masses duveteuses étoilées qui prolifèrent et donnent des filaments mycéliens qui envahissent toute la surface de la carotte.

Ces filaments de mycélium nés de la germination des spores sont prélevées aseptiquement et repiqués sur d'autres carottes où ils se développent abondamment.

DEUXIÈME TECHNIQUE SUR BOUILLON DE CHOUX :

On stérilise à l'autoclave un cristallisoir avec couvercle de verre, renfermant un bouillon de feuilles externes de choux et à la surface duquel est placé un trépied de verre. On dépose aseptiquement sur le trépied le chapeau (lamelles dirigées vers le bas) du carpophore dont les spores ont été contrôlées au préalable. Couvercle fermé, on place le tout dans un endroit sombre pendant 12 à 24 heures.

Très lentement, on voit apparaître au fond du cristallisoir un dépôt formé par le mycélium né de la germination des spores. Vers le dixième jour, on ensemence ce mycélium sur carotte. Très vite la culture mycélienne se développe et envahit la carotte d'un duvet blanc de neige.

On sélectionne par ce procédé différents mycéliums nés des spores provenant de différents carpophores produits en cave et provenant de blocs de terre prélevés en des lieux différents, à la limite externe des « ronds de sorcières ». On prélève à cet effet les spores au début de leurs développements, on les dilue dans du bouillon stérile de feuilles externes de choux et on les ensemence en stries sur carottes en tubes étranglés. On obtient ainsi des mycéliums qui se développent plus ou moins vite sur carottes et qui renferment une teneur en principes antibiotiques variables selon leur origine. Ainsi, nous avons obtenu une souche de mycélium sélectionnée à croissance relativement rapide et riche en principes antibiotiques qui servira aux repiquages sur carottes et à l'ensemencement des milieux de production.

D. — **Repiquages du mycélium sélectionné de spores sur milieux de production**

La technique de HOLLANDE (33), dont nous avons précisé et rationalisé l'exécution, comprend trois stades :

PREMIER STADE : ENSEMENCEMENT DU MILIEU A A BASE DE CAROTTES.

Nous repiquons aseptiquement par bouturage le mycélium sélectionné de sporée sur des rectangles de carottes déposés dans de gros tubes étranglés, préalablement stérilisés à l'autoclave à 115° (Milieu A).

Nous préparons ainsi une douzaine de tubes qui après 15 jours sont abondamment cultivés. Nous mettons 2 tubes de côté, afin d'entretenir la souche par repiquage sur un même milieu tous les mois. Les dix autres tubes serviront à ensemencer le milieu B à base de grains d'avoine.

Durée du premier stade de la culture : quinze jours.

DEUXIÈME STADE : ENSEMENCEMENT DU MILIEU B A BASE DE GRAINS D'AVOINE.

Nous prélevons aseptiquement des lambeaux de mycélium de bouturage développé sur carottes, nous les découpons en petits rectangles à l'aide d'instruments stérilisés. Nous répartissons ces rectangles de mycélium dans dix erlenmeyers stériles de trois litres renfermant le milieu B. Nous laissons la culture se développer à l'obscurité de la cave, et à température constante de 16° pendant 1 mois et demi en agitant les erlenmeyers deux fois par semaine, afin d'obtenir une culture homogène sur tous les grains.

PRÉPARATION DU MILIEU B — dans un erlenmeyer stérile de trois litres — nous introduisons :

Grains d'avoine trempés au préalable 12 heures dans l'eau de source	300 g
Eau de carottes diluée au 1/2	50 ml
Plasmolysat de levure Byla	0,10 g
Glucose pur en poudre	0,50 g

Nous stérilisons ce milieu à 115° pendant 25 minutes sans dépasser cette température par suite de la présence du glucose. Nous préparons l'eau de carotte au demi en faisant bouillir pendant dix minutes cent grammes de carottes râpées dans 200 ml d'eau de source. Nous exprimons le tout à travers un linge et nous étendons le filtrat exprimé d'un volume égal d'eau de source. Nous dissolvons dans 50 ml de cette eau 10 centigrammes de plasmolysat de levure répondant à la formule suivante pour 100 grammes de poudre :

Glucides	47,00	g
Protides	40,50	g
Lipides	1,25	g
Matières minérales	7,25	g
Eau	4,00	g
Thiamine	0,003	g
Riboflavine	0,0028	g
Nicotinamide	0,050	g
Acide pantothénique	0,017	g

Durée de ce stade : six semaines sont nécessaires pour que tous les grains soient envahis de mycélium. La quantité de grain contenue dans un erlenmeyer suffit pour ensemencer une trentaine de fioles de Roux contenant le milieu C.

TROISIÈME STADE : ENSEMENCEMENT DU MILIEU C (milieu 200 de Hollande modifié) avec les grains d'avoine envahis par le mycélium du milieu B.

LE MILIEU C constitue le véritable milieu de production de mycélium de *Clitocybe gigantea.* Pour le préparer, nous mélangeons dans un grand récipient en verre(et non en métal) :

Carottes broyées	250	g
Son d'avoine	125	g
Plasmolysat de levure	0,250	g
Eau de source	625	g

Nous répartissons ce milieu dans dix fioles de Roux bien propres que nous stérilisons à 110° à l'autoclave pendant vingt-cinq minutes, à deux reprises à vingt-quatre heures d'inter-

valle. Nous ensemençons chaque flacon de Roux avec les grains riches en mycélium du milieu B en opérant aseptiquement au moyen d'une pelle en toile métallique inoxydable flambée au bec Bunsen. Nous plaçons les fioles de Roux à la cave à une température constante de 16°.

Durée du troisième stade : six semaines; au bout de ce temps, nous obtenons un mycélium abondant et riche en principes antibiotiques, en moyenne 40 à 60 g de mycélium frais par fiole de Roux.

Durée totale de la culture du mycélium de sporée sélectionnée par cette méthode : trois mois et demi.

E. — **Amélioration de cette technique et mise au point d'une nouvelle méthode sur billes de verre**

Par divers essais au cours de nos cultures nous avons cherché à :

1° — Accélérer la production du mycélium actif afin de diminuer la durée de culture.

2° — augmenter la quantité de mycélium produit dans chaque fiole de Roux,

3° — éviter la souillure du mycélium par des débris du milieu de culture dont il est difficile de se débarrasser et qui gênent l'extraction.

Pour accélérer les cultures, nous avons ajouté aux milieux B et C un oligoélément, le zinc. L'adjonction de 0,05 g °/₀₀ de SO_4Zn aux milieux de culture a ralenti la prolifération mycélienne par rapport à la culture témoin, tandis que l'adjonction de 0,001 g °/₀₀ a accéléré la prolifération par rapport au témoin.

Nous préparons une solution à 0,1 g °/₀₀ du SO_4Zn dans l'eau de source et nous remplaçons dans l'eau de carotte au 1/2, 35 ml d'eau de source par 35 ml de sol. de SO_4Zn à 0,1 °/₀₀ dilué au dixième pour le milieu B. Pour le milieu C, nous remplaçons sur les 625 ml, 100 ml d'eau de source par 100 ml de sol. de SO_4Zn à 0,1 °/₀₀ dilué au dixième dans l'eau de source pour le milieu C. Nous avons observé qu'après stérilisation à

l'autoclave, les milieux additionnés de SO_4Zn sont nettement moins bruns que les témoins. Tout se passe comme si le SO_4Zn à l'état de traces, protège les constituants du milieu contre l'oxydation et l'action de la chaleur à l'autoclave.

Par cette modification, nous obtenons un mycélium abondant, riche en principes antibiotiques, en deux mois et demi, au lieu de trois mois et demi avec la technique initiale.

Par réduction progressive de la quantité de milieu C dans les fioles de Roux, nous avons observé une augmentation du poids de mycélium produit. Un faible volume de milieu est donc suffisant, 50 g de milieu permettent de recueillir 80 à 100 g de mycélium frais par flacon contre 40 à 60 g avec le volume de milieu utilisé dans la technique initiale.

Les débris du milieu C, constitués par du son d'avoine et de la carotte broyée, adhèrent fortement au mycélium et sont difficiles à détacher de celui-ci. Le nettoyage supplémentaire entraîne une perte considérable de matière première au moment de l'extraction. Afin d'éviter cet inconvénient, nous avons filtré le milieu C modifié et additionné de 0,001 ‰ de SO_4Zn. Nous avons réparti ce milieu liquide dans les boîtes de Roux avec billes de verre comme support à raison de 50 ml de milieu liquide par fiole. Le tout est stérilisé à 110^0 pendant 25 minutes deux fois à 24 heures d'intervalle et ensemencé avec les grains d'avoine du milieu B comme dans la méthode initiale. Sur ce milieu, nous obtenons ainsi, en quatre semaines, un mycélium propre, exempt de tous débris et plus riche en principes antibiotiques.

Nous avons également observé une certaine activité antibiotique du milieu de culture sur billes de verre vis à vis du *Staphylococcus aureus* (Souche d'Oxford fournie par l'Institut Pasteur) ce que nous n'avons pas pu constater jusqu'à présent sur les milieux semi-fluides initiaux, riches en cellulose et en produits de dégradation de la lignine.

F. — **Observations concernant les conditions de culture**

Les conditions de température et de lumière voisines de celles existant dans le sol et réalisées dans la cave de notre laboratoire ont donné les meilleurs résultats. Nous avons

constaté qu'une température supérieure à 25° C ainsi qu'une lumière vive arrêtent la prolifération du mycélium et la production des principes antibiotiques.

La proclitocybine, dont nous décrirons la technique d'isolement au Chapitre IV, est abondante dans les mycéliums jeunes et tend à disparaître vers le quatrième mois de la culture. Un vieux mycélium repiqué sur un milieu C neuf est capable de reproduire de la proclitocybine au bout de deux à trois semaines. Tout se passe comme si ce principe était une substance biochimique de croissance particulièrement abondante dans les cellules en voie de prolifération qui constituent les filaments périphériques de la culture mycélienne. Ces filaments sont des organes à activité physiologique intense, ils forment la partie périphérique des « ronds de sorcière » qui donne naissance aux carpophores quand les conditions deviennent favorables Dans ces carpophores les cellules de l'hyménium et les spores sont à leur tour les organes les plus riches en clitocybine et en proclitocybine. Nous avons observé que nos extraits anti-microbiens de mycélium jeune constituent une source énergétique très nutritive pour un grand nombre de moisissures, qui s'y développent d'une façon intense et rapide.

Le mycélium « blanc neigeux » des cultures devient « chamois » à partir du troisième mois. C'est à cette période que nous avons observé l'apparition de traces d'acide cyanhydrique libre, constatées, après chauffage, par introduction de papiers picro-sodés dans le goulot des flacons de Roux. Puis au fur et à mesure du vieillissement des cultures l'intensité de la réaction s'amplifie et vers six à neuf mois l'odeur en est perceptible même à froid, surtout si l'on bouche les flacons au caoutchouc pendant 24 heures. Le mycélium vieux élabore donc de l'acide cyanhydrique en quantité appréciable. A l'état jeune (comparable à la forme *Clitocybe candida* dans la nature) le mycélium de culture d'un mois et demi ne libère pas d'acide cyanhydrique, même après chauffage et hydrolyse acide (par l'acide chlorhydrique) à chaud. L'acide cyanhydrique dégagé par les Clitocybes a été signalé depuis longtemps par les mycologues de Lyon. LOCQUIN (36) croyait, en 1947, que cet

acide dégagé par le *Clitocybe gigantea* était la substance antibiotique de ce champignon. RIVIÈRE, THELY et GAUTRON ont montré dès 1947 que cette opinion n'était pas fondée. (50)

D'autre part, nous n'avons jamais obtenu ni par chauffage, ni par hydrolyse acide de nos extraits antibiotiques un dégagement d'acide cyanhydrique détectable au réactif picro-sodé de Guignard. Les mycéliums anciens, riches en acide cyanhydrique sont dépourvus de toute activité anti-microbienne d'après les divers essais que nous avons effectués au cours de nos recherches.

Chapitre iv

EXTRACTION DES PRINCIPES ACTIFS DU MYCÉLIUM DE CULTURE

Le mycélium de culture que nous produisons au laboratoire à partir de la « sporée » du *Clitocybe gigantea,* nous fournit à des intervalles de temps désirés un matériel assez abondant pour permettre les essais d'extraction des principes actifs. Ceux-ci sont intra-cellulaires et ne diffusent pas dans les milieux nutritifs qui se trouvent à son contact, à l'inverse des antibiotiques produits par les moisissures comme la pénicilline ou la streptomycine.

Nous avons utilisé pour l'étude des constituants du mycélium, un mixer semi-industriel permettant de déchirer les tissus et les cellules vivantes pour libérer les substances solubles. Le broyage du champignon à 8000 tours/minute en présence du solvant approprié doit être limité dans le temps afin d'éviter un échauffement qui détruirait les structures fragiles. Les couteaux doivent être fréquemment aiguisés; le rendement en matière extractive dépend de l'intensité du broyage.

Les travaux de HOLLANDE, de RÉBERT, de RIVIÈRE et collaborateurs, ont mis en évidence un corps antibiotique obtenu après divers traitements (acétone, alcool, éther de pétrole, etc . . .) des carpophores et du mycélium de culture du *Clitocybe gigantea.* Cette « clitocybine » étudiée par HOLLANDE présente un pH fortement acide de 2,9 ce qui nous a fait douter de sa préexistence comme telle dans la cellule vivante. Nous avons néanmoins commencé par extraire ce corps selon la tehnique décrite par HOLLANDE en y apportant les aménagements opératoires nécessaires pour supprimer au maximum les temps morts. Cette étude nous a semblé indispensable pour nos essais ultérieurs.

A. — **Extraction de la clitocybine de Hollande selon le procédé de son auteur**

Le procédé de HOLLANDE comprend 3 phases :

a) — La préparation du mycélium frais

b) — L'extraction proprement dite

c) — La purification

a) LA PRÉPARATION DU MYCÉLIUM :

I) NETTOYAGE :

Nous nettoyons le mycélium sous un filet d'eau courante, le plus possible, au moyen d'une brosse douce afin de le débarrasser du son et des débris de carottes du milieu nutritif. Nous l'essorons sans pression au moyen de linges secs, une pression trop forte détruirait la majeure partie des principes actifs et donnerait un liquide brun (action des oxydases) qui renferme des substances très toxiques (33).

2) TRAITEMENT A L'ACÉTONE :

Ce traitement a pour but de déshydrater rapidement le mycélium qui renferme environ 90 % d'eau, de le délipider et de le dépigmenter partiellement.

A 200 grammes de mycélium frais, coupé en petits morceaux à l'aide de ciseaux en évitant de hacher, nous ajoutons 400 ml d'acétone pure, redistillée; nous broyons le tout 1 minute au mixer à 8000 tours/minute, le broyeur étant actionné par les courroies d'un moteur électrique placé à distance (pour éviter l'inflammation). Nous filtrons immédiatement le broyat acétonique sur entonnoir Büchner muni d'une rondelle de papier filtre à la trompe à vide et nous reprenons le mycélium ainsi traité par une nouvelle quantité d'acétone égale à la première et nous effectuons un deuxième broyage de 5 minutes; nous filtrons à nouveau sur Büchner, puis nous répétons une troisième opération identique à la seconde. Il se dissout au cours de cette opération un pigment jaune.

3) TRAITEMENT A L'ÉTHANOL A 100°

Cette opération a pour but de pousser davantage la déshydratation et d'éliminer des lipides insolubles dans l'acétone et

solubles dans l'éthanol absolu (33). Nous reprenons le résidu deux fois avec 250 ml d'éthanol à 100^0; nous broyons pendant 5 minutes; nous filtrons sur Büchner et nous recommençons cette opération une deuxième fois. Nous laissons sécher rapidement à l'air libre le résidu mycélien.

4) DÉLIPIDATION :

Cette opération se fait en deux temps :

— par l'action de l'éther de pétrole(type des chemins de fer)

— par traitement à l'éther anhydre sans peroxyde.

Nous mettons la poudre mycélienne alcoolique desséchée en contact, dans un ballon, avec 200 ml d'éther de pétrole pendant une demi-heure. Nous agitons fréquemment et nous filtrons au Büchner sous vide.

Après une évaporation rapide à l'air, nous broyons la poudre mycélienne sèche avec 500 ml d'éther sulfurique pendant 5 minutes; nous filtrons sur un papier filtre plissé et non à la trompe à vide; nous laissons sécher le résidu mycélien à l'air libre jusqu'à évaporation de l'éther.

5) PULVÉRISATION :

Après ces différents traitements nous pulvérisons très finement le mycélium sec au mixer dont les couteaux viennent d'être aiguisés pour cette opération. Nous obtenons ainsi une poudre très fine, prête à l'extraction de la clitocybine de HOLLANDE.

b) L'EXTRACTION PROPREMENT DITE :

Il faut la pratiquer dès que possible, la poudre que nous venons de préparer s'altérant rapidement à l'air.

Dans un récipient en verre soigneusement rincé à l'eau distillée et séché à l'étuve nous mettons la poudre mycélienne, dont nous venons de décrire la préparation, en contact pendant 12 heures à $+ 4^0$ au frigidaire avec une solution tampon de phosphates à pH 7 dans la proportion de 100 grammes de poudre pour 100 ml de solution tampon.

PRÉPARATION DE LA SOLUTION TAMPON :

Nous mélangeons 37 ml d'une solution aqueuse renfermant

9,75 grammes de phosphate monopotassique par litre d'eau bi-distillée, avec 63 ml d'une solution contenant 11,87 grammes de phosphate disodique par litre d'eau bi-distillée.

Après un contact de 12 heures au frigidaire de la poudre mycélienne avec la solution tampon, nous obtenons une pâte que nous divisons en 4 parties égales :

Au premier quart nous ajoutons 500 ml d'éther sulfurique anhydre et pur, traité au préalable au sulfate ferreux, au carbure de calcium et au sodium tréfilé. Nous broyons au mixer à 8000 tours/minute, pendant 5 minutes sans dépasser ce temps afin d'éviter tout échauffement.

Nous ajoutons le second quart au broyat éthéré et nous mélangeons dans les mêmes conditions durant 5 minutes à 8.000 tours/minute. Successivement, nous ajoutons le troisième et le quatrième quart en complétant au fur et à mesure l'éther évaporé à son volume initial de 500 ml. Nous décantons cet éther coloré en jaune et nous le remplaçons par 500 ml d'éther neuf, anhydre et pur. Nous broyons à nouveau à deux reprises pendant 5 minutes à 8.000 tours/minute avec un arrêt de 5 minutes entre chaque broyage. Nous obtenons ainsi une solution éthérée, limpide, peu colorée en jaune. Une nouvelle reprise par l'éther de la masse épuisée ne libère plus guère de principe actif. Nous plaçons l'éther dans un ballon à distiller traversé par un courant d'air desséché par passage préalable sur une colonne de pierre ponce imbibée d'acide sulfurique. Le courant d'air sec est amené au fond du ballon au moyen d'un tube de verre et la tubulure latérale est mise en relation avec une trompe à eau afin de produire un appel d'air suffisant. Nous éliminons l'éther par un courant d'air desséché et il reste à la fin de l'opération quelques ml d'une eau laiteuse, blanchâtre mélangée à des particules de matière grasse colorées en jaune. L'apparition de ces particules graisseuses montre que l'opération est terminée. Nous filtrons le résidu aqueux trouble sur papier filtre mouillé sans pli; nous rinçons le fond du ballon avec 3 ml d'eau bi-distillée que nous versons dans le filtre.

Il est impossible d'éliminer l'éther par distillation au bain-marie sans altérer fortement les propriétés antibiotiques de

l'extrait. La distillation sous vide est également impraticable car dans ces conditions la clitocybine est volatile.

c) LA PURIFICATION : PREMIÈRE PURIFICATION PAR L'ACÉTONE-ÉTHER :

Nous mélangeons le filtrat restant et nous le plaçons dans une ampoule à décantation de 500 ml. Nous ajoutons un mélange à parties égales d'acétone pure redistillée et d'éther sulfurique anhydre à raison de n fois 10 ml de filtrat obtenu sachant que 10 ml du mélange acétone-éther dissout 1 ml d'eau. Nous obtenons ainsi une solution limpide, toute la solution résiduelle ayant été dissoute.

Nous ajoutons à ce mélange un nombre de ml égal à celui du filtrat initial d'éther de pétrole. Nous agitons par renversements successifs l'ampoule à décantation que nous laissons reposer ensuite pendant 1 heure : l'eau se sépare au fond de l'allonge. Cette eau contient des impuretés, des pigments et la couche surnageante d'acétone-éther la clitocybine.

Après séparation l'acétone-éther est versé dans un ballon et éliminé comme auparavant pour l'éther par un courant d'air sec. Il reste à la fin une très petite quantité d'eau de 1 à 2 ml très riche en clitocybine. Nous la versons dans le couvercle d'une boîte de Pétri que nous plaçons au congélateur à une température de — 5^0. L'eau gèle et la glace formée se sublime lentement dans l'air froid et sec (2 jours pour 1 ml de solution). DESHYDRATATION PAR LYOPHILISATION : pour déshydrater des quantités plus importantes de solution extractive de clitocybine, nous déshydratons par sublimation au lyophilisateur dans un vide très poussé à la température de — 40^0. Après le départ de la glace il reste une poudre jaunâtre et amorphe.

DEUXIÈME PURIFICATION :

La poudre amorphe que nous venons d'obtenir par dessiccation à froid est maintenue à — 5^0 et traitée dans ces conditions par l'éther sulfurique, pur, anhydre et préalablement refroidi. Ces précautions sont indispensables, la clitocybine étant volatile à la température du laboratoire.

L'éther dissout la clitocybine et laisse insolubilisées les

parties de poudre amorphe constituées probablement par des produits d'oxydation de la clitocybine. Nous décantons et nous filtrons l'éther, encore fortement coloré en jaune par un pigment entraîné au cours des opérations d'extraction.

TROISIÈME PURIFICATION

Nos essais nous ont démontré que la clitocybine n'est pas absorbée par le noir animal purifié et neutre. Nous éliminons donc le pigment par addition à l'éther sulfurique d'une petite quantité de charbon animal. Nous agitons, nous décantons, nous filtrons plusieurs fois sur papier jusqu'à obtention d'une solution parfaitement incolore et limpide en prenant soin de pratiquer toutes ces opérations au frigidaire. Nous plaçons le filtrat dans un petit cristallisoir et nous l'évaporons à l'air froid.

Nous obtenons un corps cristallisé en forme de dentrites, incolore, onctueux au toucher, dégageant une odeur très prononcée de champignon et présentant une réaction fortement acide.

Il nous faut un minimum de quatre jours pour réaliser l'ensemble de ces opérations d'extraction avec un *rendement de cent cinquante mg de produit cristallisé* pour un kg de mycélium frais, ce qui correspond à la production en mycélium de culture de douze flacons de Roux.

B. — **Nouvelles données sur l'extraction des principes actifs**

Le seul critère dont disposait HOLLANDE pour identifier la clitocybine au terme de ces opérations d'extraction, était la mesure de son activité antibiotique. Nous avons recherché une réaction colorée simple qui nous permettrait de suivre plus facilement les différentes étapes de nos essais d'extraction. Nous avons fait de nombreux essais de réactions colorées sur le produit obtenu d'après le mode d'extraction décrit au chapitre précédent. Nous avons constaté que celui-ci donnait une coloration rouge vin intense en présence d'une trace de résorcine de dix gouttes d'acide sulfurique concentré, pur pour analyses.

A la coloration rouge vin se superpose une fluorescence verte lorsque le produit contient encore les pigments absorba-

bles par le noir animal. La clitocybine peu stable, perd rapidement son activité antibiotique alors que l'intensité de la réaction résorcine-sulfurique n'est pas modifiée. La réaction nous a néanmoins été utile pour suivre la destinée dans les différents solvants du corps que nous voulions extraire. Nous avons broyé le mycélium avec les différents solvants et nous avons pratiqué sur les extraits concentrés correspondants (après évaporation du solvant à basse température et reprise du résidu par un minimum d'eau distillée) la réaction résorcine-sulfurique en même temps que la mesure de l'activité antibiotique sur *Staphylococcus aureus* (Voir Chapitre VI, paragraphe A) et d'un examen du brunissement de l'extrait.

Nature du solvant	Réaction Resorcine-SO_4H_2	Action antibiotique	Brunissement
Eau distillée	+ + +	Faible	Intense
Ethanol 95°	+ + +	Forte	Faible
Méthanol pur	+ + +	Nulle	Intense
Butanol	+	Nulle	Faible
Acétone	+	Nulle	Intense
Ether sulfurique	+	Très faible	Intense
Ether de pétrole	0	Nulle	Nul
Clitocybine pure	+ + + +	Forte	Intense

L'examen de ce tableau nous montre que l'éthanol et l'eau sont les meilleurs solvants de la clitocybine et que l'éther est un mauvais solvant.

Son pouvoir extractif dépend de la quantité d'eau soluble dans l'éther.

L'éthanol à 95° donne les meilleurs résultats puisqu'il semble empêcher en même temps la décomposition de la substance active et la perte de son pouvoir antibiotique.

Il résulte de ces expériences qu'au *cours du procédé d'extraction de Hollande une part importante de clitocybine a été*

perdue (par l'action de l'éthanol et de l'eau) et que ce procédé n'empêche pas la décomposition du produit.

Le pH fortement acide (2,9) de la clitocybine de Hollande, sa grande volatilité et les données que nous venons d'établir nous ont fait douter de sa préexistence comme telle dans la cellule vivante. *Nous avons pensé à une origine hétérosidique de ce corps dont l'aglucone serait la clitocybine de Hollande.* L'isolement de la substance biologique initiale à laquelle nous avons donné le nom de proclitocybine a fait l'objet de nouvelles recherches qui nous ont permis d'obtenir, par des moyens plus simples et plus rentables, une substance sucrée présentant les caractères d'un hétéroside particulièrement abiotique lors de son dédoublement en oses et en aglucone.

C. — **Elaboration d'une méthode personnelle avec isolement d'une nouvelle substance : la proclitocybine**

Après divers essais, nous avons adopté le procédé suivant, dérivé de celui de BOURQUELOT (17). Après nettoyage pour enlever les restes du milieu de culture, nous plaçons le *mycélium frais* dans de l'éthanol à 95° où nous le découpons en petits morceaux en évitant de le hacher. Nous mélangeons 100 grammes de mycélium découpé à 200 ml d'éthanol neutre à 95° à froid et broyé à 8.000 tours/minute au mixer pendant 5 minutes à deux reprises avec un arrêt d'un quart d'heure entre les deux opérations afin d'éviter tout échauffement. Les cellules fraîches déchirées libèrent la proclitocybine soluble; nous avons constaté à l'aide de la réaction résorcine-SO_4H_2 qu'un second épuisement à l'éthanol à 95° du même mycélium n'en extrait plus guère. Les protéïnes et les ferments précipitent et le broyat ainsi obtenu est rapidement filtré au Büchner à la trompe à vide. Il donne d'une part un gâteau d'aspect cellulosique, brunissant rapidement, d'autre part un filtrat alcoolique jaune.

Nous soumettons ce filtrat à une première purification par agitation à deux reprises avec du noir animal purifié, neutre et exempt de toute humidité, satisfaisant aux essais de la Pharmacopée 1949. La proclitocybine n'étant pas fixée par le noir animal purifié nous obtenons une solution hydroalcoolique à

20^0 sous le vide de la trompe, l'éthanol est éliminé et il reste un résidu aqueux, légèrement trouble. Nous le soumettons à une deuxième purification par agitation à deux reprises au noir animal et nous filtrons. Nous déféquons le filtrat à l'acétate neutre de plomb pour éliminer les sels minéraux et les impuretés organiques azotées du champignon et du charbon. Nous éliminons l'excès de plomb en le précipitant par un courant d'hydrogène sulfuré et nous filtrons.

Le filtrat renfermant en solution la proclitocybine est incolore et limpide, mais l'élimination des traces de gaz fait apparaître un jaunissement. Nous obtenons une stabilisation pasagère par addition de quelques microcristaux d'hydroquinone. Nous évaporons la solution aqueuse à 15^0 dans le vide en atmosphère d'anhydride carbonique. Nous obtenons de petits cristaux blancs, très hygroscopiques et solubles dans l'eau et dans l'éthanol à 90^0, insolubles dans l'éthanol à 95^0 et dans l'éther donnant une réaction intense à la résorcine-sulfurique dégageant une odeur prononcée de champignon.

Pour confirmer la nature hétérosidique de la proclitocybine, nous avons également soumis notre mycélium au procédé d'extraction de HERISSEY. Nous commençons par préparer au mixer l'extrait éthanolique d'après le mode opératoire précédent. Après un premier traitement au noir animal nous filtrons l'extrait alcoolique sur Büchner. Nous évaporons le filtrat à la trompe à vide jusqu'au poids du mycélium primitif. Cette opération est faite en présence de carbonate de calcium pour éviter l'acidification. Sur une petite fraction du filtrat concentré nous déterminons la dose minima de solution d'acétate basique de plomb nécessaire à la précipitation des impuretés. Nous déféquons par addition de 1,1 fois la dose calculée. Nous ajoutons 1 g de sulfate de sodium anhydre pour 0,75 ml de solution d'acétate basique de plomb employé, puis 0,5 g de carbonate de calcium pour 1 g de sulfate de sodium. Nous triturons au mortier et nous laissons le mélange se prendre en masse, ce qui est obtenu en trois à quatre heures. Nous divisons la masse durcie en petits fragments que nous desséchons à l'exsiccateur à acide sulfurique.

Nous épuisons ensuite le produit sec par l'acétate d'éthyle pur ou de préférence dilué au demi avec de l'éthanol à 95°. Nous distillons l'éluat obtenu à la trompe à vide; nous reprenons le résidu par 10 ml du mélange à parties égales d'acétate d'éthyle et d'éthanol à 95° et nous évaporons à sec à 20 degrés en atmosphère d'anhydride carbonique ou d'azote jusqu'à obtention de microcristaux blancs, présentant les caractères identiques à ceux de la substance isolée par la méthode précédente.

Nous avons également tenté d'obtenir cette substance à l'état cristallisé par la technique classique d'extraction des hétérosides au tanin. Nous avons ajouté à la solution résiduelle hydro-alcoolique purifiée au noir animal une solution saturée de tanin à l'éther et nous avons constaté que la proclitocybine n'était pas précipitée par le tanin contrairement à ce qui se passe pour bon nombre d'hétérosides. Cette méthode n'est donc pas applicable à l'obtention de cette substance.

Quel que soit le procédé employé les cristaux de proclitocybine sont incolores et donnent les réactions analytiques des pentoses. La substance est soluble dans l'eau, dans le méthanol,, l'éthanol à 90 degrés, insoluble dans l'éther, l'éther de pétrole et l'éthanol à 95°. Elle offre une odeur particulière de champignon, une saveur sucrée et un pH de 6,2. Elle est fortemet réductrice et se dédouble par hydrolyse en sucre (s) et en aglucone qui n'est autre que la clitocybine fortement acide de Hollande soluble dans l'éther. La proclitocybine est faiblement antibiotique, mais son hydrolyse rapide libère progressivement la clitocybine très active dans les milieux de culture microbienne. Nous consacrerons les deux chapitres suivants de notre travail à l'étude comparée des propriétés chimiques et biologiques de la clitocybine et de la nouvelle substance que nous venons d'isoler.

Chapitre v

PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES PRINCIPES ACTIFS

A. — Rappel des propriétés de la clitocybine de Hollande

Ayant préparé la clitocybine d'après la technique d'extraction de son auteur, nous avons vérifié un certain nombre de propriétés déjà mises en évidence par HOLLANDE (32).

a) *Propriétés physiques.*

La clitocybine de Hollande est une substance très volatile, incolore, onctueuse au toucher, dégageant une odeur prononcée de champignon, et dont le pH est voisin de 2,9.

— *Cristallisation :*

Par évaporation rapide d'une solution éthérée de clitocybine, nous avons obtenu des cristaux en forme de dentrites, de plumes d'oie, d'éléments digités. Ces cristaux présentent en lumière polarisée les teintes multiples des lames minces.

Par évaporation lente, au réfrigérateur à — 5°, d'une solution chloroformique de clitocybine, on obtient des cristaux épais et allongés. D'après le professeur CHATELIN de Montpellier (32) ces cristaux appartiennent au système orthorombique dont les paramètres de la maille seraient d'après l'analyse aux rayons X par la méthode du cristal tournant :

(a) = 13,4 A°
(b) = 10,1 A°
(c) = 7,7 A°

Ces données minéralogiques ont permis à HOLLANDE, à défaut d'indications chimiques plus utiles, de caractériser la clitocybine. La détermination de la densité de ces cristaux est délicate, la clitocybine étant soluble dans la plupart des réactifs habituellement employés à cet effet.

— *Solubilité :*

La clitocybine de Hollande est très soluble dans l'eau, dans l'éther sulfurique, le chloroforme, l'acétone, l'alcool éthylique et l'alcool méthylique. Elle est très peu soluble dans les huiles végétales. Elle est insoluble dans l'alcool butylique, l'éther de pétrole et l'huile de vaseline.

— *Point de fusion :*

Au bain de mercure, la clitocybine de HOLLANDE fond à 77^0 et au refroidissement par suite du phénomène de surfusion, se solidifie à nouveau à 71^0.

— *Fluorescence :*

Examinés en lumière ultra-violette filtrée de Wood, les cristaux de clitocybine de HOLLANDE obtenus à partir de l'évaporation rapide d'une solution éthérée présentent une fluorescence vert-pré.

— *Adsorption :*

La clitocybine de HOLLANDE n'est pas absorbée par le charbon animal neutre; elle n'est pas absorbée par le charbon végétal mais l'alcalinité de ce dernier la détruit. La clitocybine de HOLLANDE est adsorbée par l'alumine, mais il est impossible de l'éluer à partir de l'alumine sans la détruire, peut-être à cause de l'alcalinité de cet adsorbant.

— *Efflorescence et volatilité :*

La clitocybine de HOLLANDE est une substance très volatile qui présente la curieuse propriété d'être particulièremet efflorescente en atmosphère sèche. En dissolvant quelques cristaux de clitocybine de HOLLANDE (préparés à partir de l'évaporation rapide d'une solution éthérée) dans le minimum d'eau distillée, il se forme au début un louche, blanc laiteux, qui disparaît par la suite par volatilisation. En atmosphère sèche, à la température du laboratoire, la clitocybine de HOLLANDE s'effleurit rapidement; elle se recouvre d'une efflorescence blanche très soluble dans l'eau, insoluble dans l'éther anhydre, ce qui permet de séparer par l'éther dans une ampoule à décantation le produit actif du produit de dégradation soluble dans l'eau et sans pouvoir antibiotique. Phénomène curieux, en atmosphère humide cette efflorescence est sensiblement retardée.

b) *Propriétés chimiques :*

— *Acidité et neutralisation :*

La clitocybine de HOLLANDE se comporte comme un acide dont le pH est voisin de 3, en général 2,9. On peut neutraliser cette acidité et l'amener à un pH 6,8 sans altérer le pouvoir antibiotique, par addition progressive à un poids donné de clitocybine cristallisée d'une solution aqueuse au 1/10 de phosphate disodique : pour neutraliser la clitocybine de Hollande, nous avons également utilisé des amines organiques comme l'éthanolamine, la quinine, la streptomycine.

Un excès d'alcali (soude, potasse, ammoniaque, carbonate de sodium) fait perdre à la clitocybine de HOLLANDE ses propriétés antibiotiques et amène un brunissement rapide. Il en est de même avec l'hydrate d'alumine ce qui explique les difficultés auxquelles se sont heurtés divers auteurs comme RÉBERT et RIVIÈRE lorsqu'ils ont essayé d'isoler et de purifier la clitocybine de Hollande par chromatographie sur colonne d'alumine.

Les sels de sodium, de potassium, de calcium de la clitocybine sont très hygroscopiques, solubles dans l'eau, et insolubles dans l'éther sulfurique, contrairement à la clitocybine acide qui est soluble dans l'éther.

— *Oxydo-réduction :*

La clitocybine de HOLLANDE en solution aqueuse brunit rapidement à l'air, surtout au milieu alcacin. HOLLANDE a constaté que cette coloration brune est décolorée par addition de quelques gouttes de soluté concentré d'hypochlorite de soude, tandis que l'agitation avec de la poudre de zinc est sans effet sur cette solution colorée. Une solution aqueuse concentrée de clitocybine déposée sur les téguments détermine au bout de quelques heures une coloration brun foncé de la peau, coloration qui disparaît également par addition d'hypochlorite de soude. L'intensité du brunissement des téguments est en rapport avec l'intensité du pouvoir antibiotique du produit. Cette réaction permet, suivant la coloration obtenue, de titrer en quelque sorte la teneur en principes actifs des extraits de

Clitocybine sans avoir recours chaque fois à l'emploi de cultures microbiennes. HOLLANDE, RÉBERT et moi-même avons pu constater que la teinte brune plus ou moins foncée obtenue sur les téguments est en rapport avec la puissance antibiotique du produit sur le B. K.

B. — **Nouvelles observations chimiques sur la clitocybine de Hollande**

Constitution élémentaire :

Nous avons recherché, selon les techniques habituelles de l'analyse qualitative organique, les éléments constituants de la clitocybine. En dehors du carbone, de l'hydrogène et de l'oxygène, nous avons constaté la présence d'azote et de soufre.

Propriétés réductrices :

La clitocybine possède de puissantes propriétés réductrices. Nous avons observé la réduction à chaud de la liqueur de Fehling, la réduction à froid de l'iode en milieu alcalin, du réactif de Nessler, du nitrate d'argent ammoniacal, du 2-6 dichloro-phénolindophénol.

Action de la phénylhydrazine :

Nous avons agité la solution aqueuse de clitocybine avec une solution acétique de phénylhydrazine et nous avons obtenu à la température du laboratoire un précipité rouge-orangé d'hydrazone. La production de ce précipité s'arrête au bout de 10 à 12 heures. Ultérieurement il n'y a plus formation d'osazone à chaud. Le précipité de clitocybine-hydrazone est insoluble dans l'eau froide, soluble dans l'eau à ébullition; il est soluble à froid dans l'acétone et la pyridine.

Par traitement à l'aldéhyde benzoïque nous avons régénéré la clitocybine à partir de son hydrazone avec formation de benzalhydrazone.

Action du réatif de Schiff :

La clitocybine neutralisée sous forme de sel de sodium recolore à froid le réactif de Schiff, fortement en milieu légèrement acide, faiblement en milieu neutre ou légèrement alcalin.

Action de la benzidine-chlorhydrique :

Nous mettons une goutte de solution aqueuse au 1/100ème

de clitocybine sur un papier filtre, nous laissons sécher et nous touchons avec une goutte du réactif benzidinique préparé d'après la formule suivante :

Benzidine	0,1
HCL à 25 %	1 ml
Eau q. s. p.	10 ml

Nous obtenons une coloration jaune foncée de la tache qui, au bout de 24 heures, passe progressivement au brun. Examinée aux rayons U. V. de la lampe de Wood cette tache présente une fluorescence vert-pré intense.

La réaction est d'autant plus marquée que le pouvoir antibiotique de la solution de clitocybine est plus forte. Elle est négative avec de la clitocybine qui a perdu son pouvoir antibiotique.

Cette réaction constitue un test précieux pour identifier la clitocybine active et contrôler sa stabilité. Elle paraît due à la présence d'une fonction aldéhyde exaltée par des fonctions voisines dont l'intégrité conditionne l'activité antibiotique.

Action de la résorcine :

La résorcine donne avec la clitocybine en milieu sulfurique concentré une coloration rouge lie de vin. Cette réaction nous a été très utile, lors de nos recherches d'extraction, mais étant indépendante des fonctions antibiotiques, elle ne nous a pas permis d'identifier et de contrôler le pouvoir antibiotique.

Action du bisulfite de soude :

Nous avons agité les solutions aqueuses de clitocybine avec du bisulfite de soude dans le but d'obtenir une combinaison bisulfitique qui nous permettrait d'isoler et de purifier le produit à partir des solutions extractives du champignon. Nous avons constaté que la combinaison bisulfitique se fait puisque nous n'avons plus obtenu les réactions de la fonction aldéhyde après bloquage de celle-ci par le bisulfite. Malheureusement la combinaison bisulfitique de la clitocybine est soluble dans l'eau et nous n'avons pas réussi à la séparer.

C. — **Stabilité de la clitocybine**

La clitocybine est une substance très labile et peu stable.

Elle s'altère avec le temps même si elle est conservée dans le vide. Des traces d'humidité, une température supérieure à + 4°, l'action des alcalis, l'action des solvants organiques, en particulier l'éther et le méthanol, font perdre rapidement à la clitocybine ses propriétés antibiotiques.

La neutralisation progressive de la clitocybine acide de Hollande, sans dépasser un pH de 6,8 avec transformation en sels de sodium, de potassium ou de calcium ne détruit pas le pouvoir antibiotique.

De cette expérience, il faut retenir l'observation importante que le pouvoir antibiotique de la Clitocybine de Hollande n'est pas dû à son pH acide mais bien davantage à l'intégrité de sa structure moléculaire. La neutralisation n'améliore cependant pas de beaucoup la stabilité de la clitocybine. HOLLANDE avait constaté que l'adjonction de phosphates, en particulier l'héxamétaphosphate, avait une légère action stabilisatrice sur la clitocybine. Nos observations personnelles confirment la constatation de Hollande, et nous ont conduit à retenir particulièrement trois substances : l'acide citrique, l'héxamétaphosphate de sodium et la méthionine. Nous reviendrons plus en détail sur l'action de ces trois substances au chapitre des essais de stabilisation de la Proclitocybine.

D. — **Propriétés de la proclitocybine, son hydrolyse en aglucone et en pentose**

Ayant isolé la proclitocybine d'après notre technique d'extraction personnelle, décrite au paragraphe C du ChapitreV, nous avons mis en évidence un certain nombre de propriétés. Il nous a paru intéressant de suivre le même plan pour les exposer afin de faciliter l'étude comparée des deux substances.

a) *Propriétés physiques*

La proclitocybine de préparation récente est une substance blanche très hygroscopique qui brunit rapidement à l'air. Le produit a une saveur légèrement sucrée, dégage une odeur de champignon qui rappelle l'odeur de la clitocybine de HOLLANDE. Le pH est compris entre 6,2 et 6,6. La proclitocybine est donc nettement moins acide que la clitocybine.

— *Cristallisation :*

Par évaporation rapide dans le vide et à basse température d'une solution dans l'éthanol, nous obtenons de petits cristaux en forme d'oursins qui perdent rapidement leur structure cristalline lorsqu'ils sont exposés à l'air et à la température ambiante.

— *Solubilité :*

La proclitocybine est très soluble dans l'eau, très soluble dans l'éthanol à 90°, soluble dans le méthanol, et la solution brunit rapidement (méthanolyse). Elle est très soluble dans l'acétone et le chloroforme, insoluble dans l'éther, dans l'éthanol à 95°, dans l'acétate d'éthyle, dans l'alcool butylique, dans l'éther de pétrole.

— *Point de fusion :*

Il ne nous a pas été possible de déterminer le point de fusion de la proclitocybine au bain de mercure, le produit prenant rapidement une consistance sirupeuse comme cela arrive lorsqu'on veut déterminer le point de fusion de certains oses.

— *Fluorescence :*

Examinés en lumière ultra-violette de Wood, les cristaux de proclitocybine obtenus par évaporation rapide d'une solution alcoolique présentent une légère fluorescence lactescente et bleutée.

— *Adsorption :*

La proclitocybine n'est pas adsorbée par le charbon animal neutre; les adsorbants à réaction alcaline comme le charbon végétal et l'alumine produisent un jaunissement des solutions de proclitocybine.

— *Volatilité :*

La proclitocybine n'est pas volatile comme l'est la clitocybine. Elle est particulièrement hygroscopique et se transforme rapidement à l'air en un mélange sirupeux brun dont les caractères de solubilité ne changent cependant pas.

b) *Propriétés chimiques*

— *Acidité et action des alcalis :*

La proclitocybine présente un pH compris entre 6,2 et 6,6. Celui-ci est d'autant plus élevé que le produit est fraîchement isolé. Par action des alcalis, on obtient une accélération du brunissement du produit sans qu'il soit possible de neutraliser la proclitocybine comme cela est le cas de clitocybine.

— *Oxydo-réduction :*

La proclitocybine, tout comme la clitocybine, en solution aqueuse, brunit rapidement à l'air surtout en milieu alcalin. Cette coloration brune n'est cependant pas décolorée par addition de quelques gouttes de soluté concentré d'hypochlorite de soude. Une forte agitation avec de la poudre de zinc est également sans effet sur cette solution colorée. Une solution récente de proclitocybine ne détermine pas de coloration des téguments, tandis qu'une solution ancienne, partiellement hydrolysée détermine un brunissement de la peau, tout comme la clitocybine.

— *Constitution élémentaire :*

Selon la technique habituelle de l'analyse organique, nous avons mis en évidence le carbone, l'hydrogène et l'oxygène. La proclitocybine contient également de l'azote et du soufre que nous avons mis en évidence par la méthode de recherche des éléments dans les matières organiques décrite par ROSENTHALER.

— *Propriétés réductrices :*

La proclitocybine réduit à chaud la liqueur de Fehling, à froid l'iode en milieu alcalin et le réactif de Nessler.

— *Action de la phénylhydrazine :*

La solution aqueuse de proclitocybine est agitée avec une solution acétique de phénylhydrazine pendant dix heures; il n'y a pas de formation d'hydrazone. A ébullition, par contre, nous obtenons facilement une osazone en forme caractéristique d'oursins étoilés, insoluble dans l'eau froide, soluble dans l'eau chaude, soluble dans la pyridine à froid, soluble dans l'acétone à froid. Nous avons mesuré le point de fusion des cristaux de proclitocybinosazone, lavés et séchés; au bain de mercure pF = 182° S. C. $\mp$ 2°.

— *Action du réactif de Schiff :*

Le réactif de Schiff est sans action sur la proclitocybine.

— *Action de la benzidine chlorhydrique :*

Le réactif benzidinique préparé d'après la formule indiquée au paragraphe B est sans action sur une solution aqueuse au 1/100ème de proclitocybine fraîchement préparée. Par contre, les solutions anciennes, partiellement hydrolysées, donnent une coloration jaune foncée tout comme la clitocybine.

— *Action de la résorcine :*

La résorcine, en milieu sulfurique concentré, donne, avec la proclitocybine une coloration rouge, réaction qui nous a été utile pour suivre les différentes étapes de son extraction.

— *Hydrolyse :*

Nous soumettons une solution aqueuse de proclitocybine à l'hydrolyse chlorhydrique pendant 8 heures au bain-marie bouillant avec réfrigérant ascendant. Après refroidissement on obtient une solution brune très acide que nous neutralisons par addition progressive de NH_4OH à 10 %. L'aglucone précipite sous forme de magmas bruns, tandis que la solution se décolore partiellement. Nous filtrons et nous décolorons complètement le filtrat par passage sur colonnes d'alumine. Le filtrat évaporé donne un résidu sirupeux de saveur sucrée que nous n'avons pas réussi à obtenir sous forme de cristaux par recristallisation répétée dans les solvants organiques.

E. — **Réactions colorées et essais de dosage par voie chimique**

Nous ne décrirons pas les nombreux essais de réactions colorées, que nous avons effectués, au cours de nos recherches sur la clitocybine et la proclitocybine. Trois réations colorées ont cependant particulièrement retenu notre attention :

a) *Réaction à la résorcine sulfurique*

Une prise d'essai d'environ 2 centigrammes de produit sont dissous dans 0,5 ml d'eau distillée. On ajoute quelques cristaux de résorcine et 1 ml d'acide sulfurique concentré pur pour analyses. Il se développe immédiatement à froid une belle coloration rouge lie-de-vin. La réaction est positive avec la clitocybine et la proclitocybine, elle n'est pas spécifique et indépendante des fonctions antibiotiques, mais elle permet de suivre

là destinée des principes antibiotiques au cours des différentes phases d'extraction et dans les différents solvants.

L'intensité de la coloration donne approximativement, par voie colorimétrique, la teneur en principes actifs des mycéliums de culture de différents âges. Ces essais nous ont permis de savoir que la quantité de principes actifs était maximum pour un mycélium âgé de 2 mois et demi dans les conditions de notre méthode de culture.

b) *Réaction à la benzidine chlorhydrique*

Le réactif à la benzidine chlorhydrique est utilisé en chimie analytique organique et en phytochimie pour révéler les aldéhydes et les cétones de la série aromatique avec lesquels il donne une coloration allant du jaune au brun café-au-lait avec toutes les nuances intermédiaires possibles allant jusqu'à l'orange. Nous avons utilisé le réactif tel qu'il a été proposé par MAUREL ET LALEMENT *

Benzidine	0,1 g
HCl à 25 %	1 ml
Eau distillée q. s. p.	10 ml

Nous mettons une goutte de solution aqueuse au centième du produit à examiner sur un papier filtre. Nous laissons sécher et touchons à l'aide d'un agitateur en verre avec une goutte de réactif benzidinique.

Avec la clitocybine, nous obtenons une coloration jaune qui, au bout de 24 heures, passe petit à petit au brun café-au-lait. Aux rayons ultra-violets cette tache présente une fluorescence vert-pré, la benzidine seule n'étant pas fluorescente; avec la proclitocybine en solution aqueuse fraîche au centième, nous n'obtenons pas de coloration. Les solutions âgées de 24 heures donnent une tache faible qui s'accentue au fur et à mesure que les essais sont exécutés avec des solutions de plus en plus anciennes, ce qui montre que la proclitocybine en solution libère progressivement une substance présentant vis à vis de ce réactif le même comportement que la clitocy-

* MAUREL et LALEMENT : Ann. Fals. et Fraudes 257-267, 1952.

bine de Hollande. Nous avons été frappés par le fait que cette réaction est d'autant plus marquée que le pouvoir antibiotique des produits examinés est plus intense.

c) *Réaction à l'orcine chlorhydrique:*

Le réactif à l'orcine chlorhydrique est utilisé sous le nom de réactif de Bertrand pour différencier les pentoses des hexoses.

Nous utilisons le mode opératoire suivant :

Orcine	0,01 g
Solution d'oses au 1000ème .	1 ml
ClH concentré d = 1,19 . .	4 ml

On place 10 minutes le tube au bain-marie bouillant.

Avec les hexoses, on obtient une coloration rouge-orangée. Avec les pentoses on obtient une coloration bleue-verdâtre, soluble dans l'alcool amylique.

Avec la clitocybine, la coloration est négative.

Avec la proclitocybine, nous avons constaté deux réactions :

— le réactif donne instantanément et à froid, avec une solution de proclitocybine, une intense coloration vert-pré, soluble dans l'alcool amylique en bleu présentant une belle fluorescence rouge en lumière ultra-violette ;

— avec la solution de proclitocybine au bain-marie bouillant, donc après hydrolyse, le réactif donne une coloration bleu-verdâtre, soluble dans l'alcool amylique.

La solution de proclitocybine ayant subi une hydrolyse chlorhydrique, le réactif ne donne plus aucune coloration à froid, même après plusieurs heures, d'où l'observation importante que la coloration vert-pré, obtenue à froid avec l'orcine chlorhydrique est une réaction colorée spécifique de la proclitocybine. Nous avons constaté que cette coloration disparaît au fur et à mesure de la destruction de la proclitotybine. La coloration après 10 minutes d'ébullition avec les pentoses n'a rien à voir avec la coloration directe obtenue instantanément et à froid.

Nous pensons avoir trouvé une réaction spécifique de la nouvelle substance que nous avons isolé, réaction qui pourra être adaptée à un dosage colorimétrique lorsque nous aurons suffisamment de matière première purifiée et stabilisée pour établir les courbes d'étalonnage avec un nombre suffisant de dilutions de proclitocybine.

d) *Essais de dosages par la voie chimique :*

La proclitocybine ayant de puissantes propriétés réductrices, nous avons préféré nous adresser à une méthode chimique directe qui nous éviterait la préparation de dilutions d'étalonnage, et par conséquent, de gaspiller de la substance dont l'élaboration est si longue et si difficile.

Lors de nos essais chimiques, nous avons constaté que la proclitocybine décolorait l'iode en milieu alcalin à froid. La réaction n'est pas instantanée, elle est d'autant plus lente que l'alcali utilisé est plus faible. La vitesse de la réaction dépend aussi de l'excès d'iode. Cette réaction nous a servi à effectuer un dosage iodométrique de la proclitocybine. Dans ce dosage, l'iode employé doit toujours être en excès par rapport à l'antibiotique. Mais la solution extractive étant de titre variable, il est nécessaire d'évaluer au préalable l'ordre de grandeur de la concentration en proclitocybine à l'aide de la méthode microbiologique.

Par exemple : pour une zone d'inhibition d'un diamètre de 25 mm sur le *Staphylococcus aureus* (pour le mode opératoire, voir Chapitre VI, paraphe B), on utilise 0,5 ml de solution extractive de proclitocybine à laquelle on ajoute dans une fiole cônique bouchant à l'émeri de 5 ml :

I 0,1 × N . . . . . 2,5 ml
Sol. CO_3Na_2 crist. à 15 % . 2,5 ml

On place la fiole bouchée à l'obscurité à une température comprise entre 20° et 22°, pendant une demi-heure en agitant de temps en temps. Puis on acidule par HCl N à raison de 5 ml ajoutés goutte à goutte en évitant tout échauffement en présence de phénolphtaleine (R). On titre l'excès d'iode libre à l'aide d'une solution de thiosulfate de sodium 0,1 × N

en présence d'empoi d'amidon (R) jusqu'à décoloration complète.

D'autre part, on pratique un essai à blanc sans attaque alcaline de la proclitocybine. A cet effet, on introduit dans une deuxième fiole cônique bouchant à l'émeri de 5 ml, 0,5 ml de solution extractive de proclitocybine, on ajoute 2,5 ml d'iode 0,1 × N et on titre immédiatement l'iode libre à l'aide de la solution de thiosulfate de sodium 0,1 × N en présence d'empoi d'amidon. La quantité d'iode absorbée dans ces conditions, toujours très faible, doit être déduite de la quantité trouvée précédemment.

Sur la même quantité de solution extractive purifiée provenant de la même extraction, nous déterminons le poids d'extrait sec, après évaporation du solvant : puis le poids des cendres après calcination. Nous trouvons en moyenne 15 % de cendres.

Les dosages iodométriques répétés nous ont donné en moyenne les résultats suivants : 1 ml I 0,1 × N, c = 1,0, correspond à 0,014 g de proclitocybine en tenant compte de la correction effectuée pour la déduction des impuretés minérales.

L'activité d'un antibiotique ou de ses préparations, est exprimé en unités, unités qu'ils nous faudra fixer pour la proclitocybine. En nous référant aux dosages iodométriques précédents, nous avons fixé l'unité de proclitocybine à 0-0001 g. 1 g de proclitocybine correspond à 10.000 unités et le titre d'une quantité donnée de proclitocybine correspond au nombre d'unités précédemment définies contenues dans 0,001 g de proclitocybine.

F. — **Essais de Stabilisation de la proclitocybine**

La proclitocybine, tout comme la clitocybine, est une substance très instable, mais qui n'est pas volatile aussi longtemps qu'elle n'a pas subi d'hydrolyse. L'humidité de l'air, l'élévation de la température au-dessus de + 4°, l'action de solvants organiques, en particulier du méthanol et de l'éther, décomposent le produit en deux fractions :

Une fraction très soluble dans l'eau, l'alcool, insoluble dans l'éther, de pH voisin de la neutralité, colorant en rouge la résorcine sulfurique et donnant à chaud une coloration verte avec le réactif de Bial.

Une fraction insoluble dans l'eau distillée neutre, soluble dans l'éther de pH fortement acide, colorant en rouge la résorcine sulfurique mais plus faiblement et ne donnant pas la réaction de Bial. Cette fraction très volatile brunit instantanément à l'air.

Malgré les précautions prises au cours de la technique d'extraction décrite au Paragraphe C du chapitre V, la proclitocybine perd toute activité antibiotique au bout de cinq à six jours. Le pouvoir antibiotique paraît donc lié à l'intégrité de sa structure dans ses moindres détails. Même conservée dans le vide, la proclitocybine perd rapidement son activité antibiotique.

Il nous a paru indispensable de procéder à des essais de stabilisation susceptibles d'inhiber les processus de dégradation de la proclitocybine. Ces processus obéissent probablement aux mécanismes généraux de l'autoxydation ; les opérations d'extraction entraînent une brusque rupture des conditions de vie qui assuraient la croissance et le développement du mycélium. L'enchaînement des réactions biochimiques qui conditionnaient l'équilibre des deshydrogénations et des oxydations vitales se trouve rompu dès le début des opérations d'extraction, mais l'action des vecteurs d'énergie photochimique, calorifique et catalytique se poursuit. L'oxygène continue à être fixé. Des recherches à l'aide de diverses techniques (21,57) ont montré que la fixation de l'oxygène était précédée par une sensibilisation initiale. Nous avons procédé aux essais suivants, ayant pour objet de retarder l'autocatalyse par des mesures s'opposant méthodiquement aux conditions de leur déclanchement et de leur développement :

a) Supression des effets sensibilisateurs initiaux,
b) Emploi d'antioxydants,
c) Adjonction de synergiques.

a) *Suppression des effets sensibilisateurs initiaux.*

Nous avons éliminé complètement l'éther, le méthanol et l'acétone comme solvants, ces produits entraînant, même à faible dose, la destruction de la proclitocybine. Nous avons évité toute élévation inutile de la température et en particulier supprimé l'échauffement du au broyage en entourant le mixer d'un bain de glace pilée. Afin de réduire l'effet sensibilisateur d'ions métalliques, nous avons opéré avec un appareillage en acier inoxydable. Il est particulièrement important que les couteaux du mixer cèdent le minimum d'ions métalliques lors du broyage à haute vitesse qui produit un important frottement au contact du solvant, du matériel à broyer et du métal.

La sensibilisation par les pigments et l'action des enzymes (oxydases, etc...) commence à se faire dès le premier instant du broyage. Pour empêcher leur action, nous procédons à une précipitation rapide des protéïnes en même temps qu'à une déshydratation partielle par l'éthanol à 95°. Mais l'éthanol n'inhibe pas complètement et instanément l'action des enzymes, car le mycélium, riche en eau amène une dilution non négligeable de l'éthanol. D'autre part, la faible proportion d'eau dans l'alcool à 95° entraîne la présence d'un taux d'oxygène dissout dont il faut tenir compte.

Comme il a été prouvé par l'expérience (21) que l'oxygène dissout a une action sensibilisatrice marquée sur les phénomènes d'autoxydation, nous avons soumis l'éthanol servant comme solvant d'extraction à une ébullition préalable de 5 minutes suivie d'un refroidissement brusque au congélateur afin de diminuer le taux d'oxygène dissout.

L'action des pigments et des enzymes ne peut se faire qu'en présence d'humidité et nous pensons que la déshydratation par l'éthanol n'est pas suffisamment efficace pour empêcher le déclanchement des phénomènes de dégradation. Pour cette raison, nous avons procédé à une déshydratation du mycélium avant de le soumettre aux opérations d'extraction. Nous avons congelé rapidement le mycélium et éliminé une partie importante de l'eau à basse température par lyophilisation et

soumis ensuite ce mycélium à notre technique d'extraction décrite au paragraphe C du Chapitre IV.

b) *Emploi d'antioxydants.*

1) - *Quelques notions théoriques sur les antioxydants :*

L'antioxydant est une molécule dont la constitution structurale est telle qu'elle renferme des atomes d'hydrogène labile. L'antioxydant donne naissance lui aussi à des radicaux libres et à des hydroperoxydes agissant cette fois non plus comme agents de propagation mais comme agents de neutralisation, conduisant à des dérivés énergétiques stables. L'antioxydant peut être assimilé à un catalyseur négatif ; il se comporte alors comme un principe autoxydable dont il prend préférentiellement la place en rompant les réactions en chaîne de l'autocatalyse.

La dose efficace de l'antioxydant ne doit pas dépasser un certain seuil au-delà duquel on observe une inversion de l'activité qui devient pro-oxydante (60). Ainsi l'acide ascorbique n'exerce une efficacité antioxydante que s'il est introduit à un taux inférieur à 4×10^{-4}, seuil d'inversion pro-oxydante (57).

2) - *Expériences :*

Parmi les nombreuses substances douées de propriétés antioxydantes, nous avons retenu le sulfite de sodium, l'hydroquinone, l'acide ascorbique, le gallate de propyle, et la thiourée. Au préalable, nous avons effectué des essais afin de vérifier si l'antioxydant ajouté ne possédait pas de pouvoir antibiotique d'une part et n'inhibait pas le pouvoir antibiotique d'autre part. Aucune de ces substances ne possède d'activité antibiotique propre. Aucune d'entre elles n'inhibe l'activité antibiotique de la proclitocybine. Nos premiers essais ont porté sur le sulfite de sodium à la dose de 10^{-3}.

Nous avons réparti en ampoules scellées que nous avons divisées en quatre lots avec chaque fois un témoin sans antioxydant. Nous avons déposé :

— le premier lot à + 4° au frigidaire et à l'obscurité,
— le deuxième à la température du laboratoire et à l'obscurité,
— le troisième à la température du laboratoire et à la lumière,
— le quatrième à l'étuve à 37° et à l'obscurité.

Nous avons observé ce qui s'est passé au bout de 24 heures, de 3 jours et de 15 jours en notant la coloration des solutions contenues dans les ampoules et en pratiquant à ces intervalles de temps des mesures de l'activité antibiotique sur le *Staphylococcus aureus*, souche d'Oxford fournie par l'Institut Pasteur.

Lots	Après 24 heures		8e jour		15e jour	
	Aspect	Act. ant	Aspect	Act. ant	Aspect	Act. ant
Témoin I	incolore	24 mm	lég. jaune	0	lég. jaune	0
Essai I	incolore	25 mm	incolore	13 mm	incolore	0
Témoin II	jaune	20 mm	jaune	0	jaune-brun	0
Essai II	incolore	22 mm	incolore	11 mm	incolore	0
Témoin III	jaune	22 mm	jaune	0	jaune	0
Essai III	incolore	22 mm	incolore	0	lég. jaune	0
Témoin IV	jaune int.	5 mm	jaune int.	0	jaune-brun	0
Essai IV	incolore	4 mm	lég. jaune	0	lég. jaune	0

Il résulte de ce tableau qu'après 15 jours tous les lots avaient perdu leur pouvoir antibiotique. Le brunissement de nos préparations et la perte de l'activité antibiotique sont deux choses différentes puisque les ampoules restées incolores grâce à l'addition de sulfite de sodium, perdent leur pouvoir antibiotique au même titre que les ampoules jaunies et non protégées par l'addition d'antioxydants.

Nous indiquons ci-dessous sous forme de tableau les essais que nous avons pratiqués par la suite dans des conditions semblables avec l'hydroquinone, le gallate de propyle, l'acide ascorbique, la thiourée :

Antioxydant ajouté		Diamètre de la zone d'inhibition sur Staphylococcus aureus				
Nature	Concentration	1er jour	6e jour	9e jour	15e jour	21e jour
Sulfite de Na	10^{-3}	25 mm	13 mm	0	0	0
Hydroquinone	10^{-4}	24 mm	18 mm	12 mm	0	0
Acide l-ascorbique	10^{-4}	26 mm	14 mm	0	0	0
Thiourée	5×10^{-5}	25 mm	22 mm	20 mm	16 mm	11 mm
Gallate de propyle	10^{-5}	25 mm	21 mm	18 mm	14 mm	12 mm
Témoin	0	26 mm	11 mm	0	0	0

Ce tableau montre que la thiourée et le gallate de propyle ont le meilleur effet protecteur, l'hydroquinone est peu active, l'acide ascorbique et le sulfite de sodium n'ont pas d'action stabilisatrice sur la proclitocybine.

c) *Adjonction de synergiques.*

1) - *Notions sur les synergiques :*

Les travaux de PRIVETT et QUACKENSBUSCH (44), de WATTS (60), de VALTEIGH et collaborateurs (54), de CLAUSEN et collaborateurs (16), ont montré que certains principes : acide citrique, polyphosphates, hexamétaphosphates, aminoacides intensifient l'efficacité des antioxydants en exerçant une action stabilisante sur les inversions ainsi qu'un effet d'épargne.

Les synergiques agissent par un mécanisme qui n'est pas encore entièrement expliqué. L'adjonction de substances synergiques aux systèmes antioxydants permet une multiplication des indices de protection allant de 1,5 à 4. L'activité des synergiques peut être rattachée à différents facteurs :

— formation de complexes avec les éléments métalliques ionisés,

— combinaison directe avec les radicaux libres,

— inactivation des radicaux libres peroxydiques par formation de polymères qui ne réagissent plus.

Les synergiques agiraient principalement en inhibant les destructions de peroxydes.

2) - *Expériences :*

Comme pour les antioxydants, de nombreuses substances sont douées d'activité synergique. Nous avons retenu l'acide citrique, l'hexamétophosphate de sodium et la méthionine, substances dont l'activité synergique a été prouvée par de nombreux travaux et qui ont fait leurs preuves en pharmacie et en bromatologie. Nous associons ces substances aux antioxydants doués d'activité protectrice sur la proclitocybine. Nous avons effectué des essais dans des conditions semblables à celles décrites précédemment.

Il résulte de ces expériences, que trois systèmes sont douées d'une activité intéressante sur la proclitocybine :

— le système hydroquinone-méthionine,

— le système gallate de propyle-acide citrique,

— le système thiourée-hexamétaphosphate de sodium.

Conditions expérimentales :

— Addition à la solution de proclitocybine d'un système antioxydant aux doses indiquées dans le tableau ci-dessous.

— Contrôle du pH de la solution, qui doit être compris entre 6,2 et 6,4.

— Conditionnement en petits flacons, genre flacons de pénicilline, soigneusement nettoyés, rincés trois fois à l'eau distillée et stérilisés au four Pasteur.

— Préparation d'une solution de proclitocybine à 1 ‰ avec de l'eau bi-distillée préalablement bouillie et refroidie.

— Conservation de ces flacons à la glacière à la température de $+4°$ et à l'obscurité.

— Dilution de ces échantillons afin d'obtenir un titre final de 2×10^{-5}.

— Mesure de l'activité antibiotique en imprégnant avec ces dilutions des carrés de papier filtre de 10 mm de côté, en rappelant que le pouvoir d'imbibition de ces carrés est de 0,03 ml.

— Dépôt des carrés dans les boîtes de Pétri, ensemencés aussi régulièrement que possible avec *Staphylococcus aureus* (souche d'Oxford, fournie par l'Institut Pasteur) sur milieu solide.

— Lecture et mesure du diamètre de la zone d'inhibition après 12 heures.

Antioxydants	Synergiques	Diamètre de la zone d'inhibition sur Staphylococcus aureus				
		1er j.	6e j.	9e j.	15e j.	21e j.
Hydroquinone à la conc. 10^{-4}	Méthionine à la conc. 10^{-4}	24 mm	22 mm	17 mm	14 mm	12 mm
Thiourée à la conc. 5×10^{-5}	Héxamétaphosphate de Na à la conc. 5×10^{-5}	26 mm	25 mm	25 mm	23 mm	22 mm
Gallate de propyle à la conc. 10^{-5}	Acide citrique à la conc. 10^{-5}	25 mm	25 mm	23 mm	21 mm	19 mm

Le système thiourée-hexamétaphosphate de sodium assure la meilleure protection. Pour l'application de ces essais nous n'avons pas retenu l'hydroquinone étant donné que celle-ci présente une certaine toxicité et que son introduction dans l'économie est prohibée.

En conclusion de cette étude, il apparaît que les moyens de lutte contre les phénomènes de dégradation de la proclitocybine doivent être précoces, multiples et simultanés. Raison pour laquelle nous préconisons :

— une déshydratation rapide du mycélium préalablement aux opérations d'extraction,

— l'élimination de l'action de l'oxygène dissout par ébullition des solvants suivie d'un refroidissement rapide,

— l'élimination de l'influence des ions métalliques par l'utilisation d'un appareillage en acier inoxydable,

— l'élimination de l'action calorique due au frottement du mixer tournant à haute vitesse, en entourant celui-ci d'un manchon de glace pilée,

— l'adjonction à l'éthanol bouilli et refroidi destiné aux opérations d'extraction du système antioxydant gallate de propyle conc. 10^{-5} — acide citrique conc. 10^{-5},

— l'adjonction à la solution résiduelle, après l'évaporation de l'éthanol à basse température par distillation sous vide, du système antioxydant thiourée conc. 10^{-5} — hexamétaphosphate de sodium conc. 5×10^{-5},

— conditionnement sous azote et conservation du produit à $+4°$.

Ces précautions permettent d'obtenir une stabilisation suffisante pour effectuer les essais microbiologiques et biologiques, mais leur efficacité reste cependant relative, étant donné qu'il est difficile d'éliminer tous les effets sensibilisateurs initiaux d'une substance aussi fragile que la proclitocybine et que les systèmes s'usent au fur et à mesure des réactions d'antioxydation.

D'autre part, l'adjonction de ces substances gêne les recherches que nous aurions voulu entreprendre sur la constitution chimique et la structure du produit isolé du mycélium.

Chapitre VI

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DES PRINCIPES ISOLÉS DU CLITOCYBE GIGANTEA

A. — **Activité antibiotique in vitro de la clitocybine de Hollande**

Les travaux de HOLLANDE et de RÉBERT ont mis en évidence l'action antimicrobienne de la clitocybine sur des germes Gram positif et Gram négatif ainsi que sur le Bacille de Koch. RIVIÈRE et collaborateurs (51) qui ont continué pendant un certain temps les recherches commencées par HOLLANDE ont, en outre, attiré l'attention sur l'activité antibiotique de la clitocybine envers différents protozoaires ainsi qu'envers le virus de la fièvre aphteuse.

1° *Action sur les germes Gram positif et Gram négatif*

Nous résumons dans le tableau suivant l'ensemble des résultats obtenus par RÉBERT (45) sur six germes pathogènes avec des extraits de spores expérimentés par la technique en milieu solide dérivée de celle de VINCENT et WHITGROWE (45). Dans ces expériences, la quantité d'extrait déposée sur le papier filtre testé était soit 0,03 ml soit 0,06 ml comme il est indiqué en haut de chaque colonne du tableau.

Germe étudié	Extraits de spores 1/10 au pH 4,5		Extraits de spores 1/10 au pH 7,5		Extraits de spores 2/10 au pH 4,5		Extraits de spores 2/10 au pH 7,5	
	0,03	0,06	0,03	0,06	0,03	0,06	0,03	0,06
Staphyl. aureus	25 mm	36 mm	26 mm	27 mm	31 mm	32 mm	29 mm	30 mm
Esch. coli	19 mm	20 mm	16 mm	17 mm	18 mm	20 mm	15 mm	16 mm
Pseud. aerug.	16 mm	18 mm	"	"	19 mm	23 mm	15 mm	16 mm
Bruc. arbort. bovis	"	"	"	"	"	"	"	25 mm
Eberth. Typh.	"	"	"	"	"	28 mm	"	27 mm

Par la suite, HOLLANDE a pu vérifier l'action sur les mêmes germes de la clitocybine et du clitocybinate de sodium qu'il avait obtenu par sa méthode d'extraction (29).

A notre tour, nous avons tenu à vérifier l'activité de la clitocybine de HOLLANDE lorsque nous avions pu en extraire avec RÉBERT selon la technique de l'auteur. Nos essais ont porté sur le *Staphylococcus aureus*, bactérie Gram positif et sur *l'Escherichia coli*, bactérie Gram négatif. Nous avons fait appel à la fois à la technique de culture sur milieu solide et à la technique en milieu liquide.

a) *Technique mettant en évidence l'activité antimicrobienne de la clitocybine sur milieu solide.*

Nous préparons le milieu de formule suivante :

Peptone exempte d'indole	10 g
Chlorure de sodium	2,5 g
Eau distillée	500 ml
Gélose	10 g

Tempérer pour dissoudre la peptone, puis ajouter la gélose. Ne pas filtrer. Autoclaver pendant 5 minutes à 110° pour dissoudre la gélose. Filtrer et répartir en tubes à raison de 10 ml par tube. Stériliser à l'autoclave à 115° pendant 20 minutes.

Couler stérilement dans des boîtes de Pétri. Après refroidissement, répartir aussi uniformément que possible une émulsion de 24 heures du microbe à étudier (émulsion dans l'eau peptonée, comprenant peptone 40 g — Chlorure de sodium 5 g — eau distillée 1.000 ml). Eliminer avec précaution l'excès d'émulsion du microbe et déposer dans les boîtes de Pétri un ou plusieurs carrés de papier filtre de 1 cm de côté, imprégnés de solution de clitocybine au millième. Placer les boîtes de Pétri à l'étuve à 37° et observer ce qui se passe après 24 et 48 heures. Mesurer les diamètres des zones d'inhibition en se rappelant qu'un carré de papier filtre de 1 cm de côté absorbe 0,03 ml de solution, soit 0,06 ml si nous superposons deux carrés de papier filtre.

Le tableau ci-dessous résume ces expériences :

Germe étudié	Après 24 heures		Après 48 heures	
	0,03	0,06	0,03	0,06
Staphyl. aureus	24 mm	30 mm	25 mm	29 mm
Esch. coli	16 mm	18 mm	16 mm	18 mm
Pseud. aeruginosa	15 mm	16 mm	16 mm	17 mm

Ces essais nous ont permis de contrôler qu'au terme de nos opérations d'extraction, nous avions effectivement obtenu de la clitocybine. Cette technique simple nous a servi tout au long de nos recherches pour suivre les destinées des principes antibiotiques lors des différentes phases de l'extraction. Cependant, nous sommes obligés d'objecter qu'il est très difficile de connaître le pouvoir de diffusion du produit essayé par la technique de culture sur gélose. Pour cette raison, nous avons en outre, eu recours à la méthode de dilution.

b) *Technique mettant en évidence l'activité antimicrobienne de la clitocybine en milieu liquide.*

La dilution du germe à étudier ensemencé sur bouillon est plus régulière que sur boîte de Pétri et non sujette à des variations d'étalement. La grande solubilité de la clitocybine dans l'eau ne pose plus le problème de la diffusibilité du produit.

Préparation de la suspension de microbes.

On commence par préparer un bouillon peptoné comprenant :

Peptone	40 g
Chlorure de sodium . . .	5 g
Eau distillée	1.000 ml

Dès l'arrivée au laboratoire, les souches de bactéries, envoyées par l'Institut Pasteur sur gélose inclinée, sont repiquées sur le bouillon dans des tubes de 5 ml. A 37°, le bouillon chargé d'une petite hanse de culture sur gélose devient uniformément trouble au bout de 24 heures. A ce moment,

une goutte de cette culture est repiquée dans un deuxième tube, et ainsi de suite pendant 4 jours afin d'obtenir une suspension standard uniforme de germes qui pourra servir aux essais.

Préparation des dilutions de clitocybine.

Nous pesons aseptiquement dans une cupule de verre préalablement tarée et stérilisée 0,1 mg de clitocybine. Nous dissolvons cette prise d'essai dans 10 ml d'eau bi-distillée neutre et stérile. Cette dilution de base sert ensuite à préparer les dilutions au 1/500ème, 1/1000ème, 1/2000ème, 1/3000ème et au 1/5000ème par simple dilution avec du bouillon frais jusqu'à obtention de 5 ml de liquide dans chaque tube. Tous les tubes sont placés pendant 24 heures à l'étuve à 37° afin de contrôler leur stérilité et de vérifier qu'aucun germe n'y a été introduit lors des manipulations.

Essais proprements dits

Nous ajoutons à chaque tube contenant 5 ml de bouillon additionné de clitocybine, 0,5 ml de la suspension standard de microbes préparée comme indiqué ci-dessus. Nous plaçons tous les tubes à l'étuve à 37° et nous observons le développement microbien après 12, 24, 48 et 96 heures.

Nous reproduisons dans les tableaux ci-dessous les résultats moyens de ces essais :

Temps	Témoin	Développement du Staphylococcus aureus				
		1/500	1/1000	1/2000	1/3000	1/5000
12 h	+	0	0	0	0	0
24 h	+ +	0	0	0	+/−	+
48 h	+ +	0	0	0	+	+ +
96 h	+ +	0	+	+ +	+ +	+ +

Temps	Témoin	Développement de l'Escherichia coli				
		1/500	1/1000	1/2000	1/3000	1/5000
12 h	+	0	0	0	+/—	+/—
24 h	+ +	0	0	0	+	+ +
48 h	+ +	0	+/—	+	+ +	+ +
96 h	+ +	0	+	+ +	+ +	+ +

La clitocybine est donc moins active sur l'*Escherichia coli* que sur le *Staphylococcus aureus*.

2° *Action sur le Bacille de Koch*

a) *Préparation de la culture du Bacille de Koch.*

Nous préparons une gélose peptonée, glycérinée de formule :

Gélose	9 g
Glycérine	25 ml
Glucose	5 g
Eau de Source	500 ml

(autoclavée à 115° pendant 20 minutes)

Nous ensemençons cette gélose en boîtes de Pétri à l'état liquide à la température de 45° avec du B. K. préacido-résistant dit « structure jeune » d'un bacille type humain isolé dans les services de microbiologie du Professeur HOLLANDE en partant de la culture homogène de Stéphane ARLOING que le Professeur HOLLANDE a bien voulu mettre à notre disposition. Après refroidissement de la masse, la culture est placée à 37° durant 3 jours. Ce milieu solide, transparent au début, prend un aspect diaphane dû au développement abondant du germe tuberculeux dans la masse.

c) *Essais mettant en évidence l'action bactériostatique.*

Nous imprégnons un carré de papier filtre de 1 cm de côté de la solution au centième de clitocybine préparée selon la technique décrite au paragraphe précédent. Nous le déposons à la surface de la boîte de Pétri aussitôt l'ensemencement avec le B. K. Après 3 jours à l'étuve à 37°, nous obtenons une zone d'inhibition dont le diamètre est compris entre 2,5 et 3 mm selon les échantillons.

c) *Essais mettant en évidence l'action bactériolytique.*

Nous déposons un papier filtre de 1 cm de côté imbibé de clitocybine en solution concentrée au dixième sur une boîte de Pétri ensemencée de B. K. (dans les mêmes conditions que précédemment), demeurée 3 jours à 37°, et présentant une forte opalescence diaphane due au développement du bacille tuberculeux. Nous observons 48 heures après remise à l'étuve à 37° la formation d'une auréole claire transparente qui, au bout de 3 jours, atteint un diamètre de 2 cm. Il y a lyse des colonies minuscules de B. K. développées en profondeur qui rendaient la masse de la gélose diaphane. Les antibiotiques utilisés à l'heure actuelle tels que la streptomycine, la dihydrostreptomycine et la kanamycine sont bactériostatiques envers le B. K. mais non bactériolytiques. Ces produits ne donnent pas d'auréole lors d'essais dans les conditions que nous venons de décrire. Parfois, les auteurs admettent qu'il y a eu bactériolyse d'un microbe sans avoir effectué une telle épreuve. En effet, la lyse du B. K. par exemple, en culture liquide peut être due à des facteurs autres que ceux appartenant à l'action antibiotique : autolyse — bactériophage anti-B. K. de Boissel — modification du pH, etc... Il est à noter que la clitocybine lyse dans les mêmes conditions le *Staphylococcus aureus*. Cette bactériolyse déjà mise en évidence par HOLLANDE (31), nous l'avons donc confirmée avec de la clitocybine de HOLLANDE que nous avions extraite selon la technique de son auteur.

B. — **Activité antibiotique in vitro de la proclitocybine**

1° *Action sur les germes Gram positif et Gram négatif.*

a) *Mise en évidence de l'activité antimicrobienne de la proclitocybine en milieu solide.*

Nous opérons de la même façon qu'avec la clitocybine. Nous répartissons une émulsion de 24 heures du microbe à étudier dans des boîtes de Pétri contenant le milieu gélosé solide; après élimination de l'excès d'émulsion du microbe nous déposons des carrés de papier filtre de 1 cm de côté imprégnés de solution de proclitocybine au millième, nous plaçons à l'étuve à 37° et nous mesurons le diamètre des zones d'inhibition après 24, 48 et 96 heures.

Le diamètre de la zone stérile est exprimé en millimètres pour un volume de 0,03 ml de solution de proclitocybine au millième.

Germe étudié	Après 24 h.	Après 48 h.	Après 96 h.
Staphyl. aureus	22 mm	28 mm	28 mm
Escherichia coli	14 mm	20 mm	20 mm

Il apparaît qu'après 24 heures l'activité antimicrobienne de la proclitocybine est plus faible que celle de la clitocybine. Elle devient cependant supérieure à celle de la clitocybine au bout de 48 heures et se prolonge au-delà de ce temps. Comme pour la clitocybine, nous avons noté une activité plus faible sur l'*Escherichia coli* que sur le *Staphylococcus aureus*.

b) *Mise en évidence de l'activité antimicrobienne de la proclitocybine en milieu liquide.*

Pour la préparation de la suspension de microbes, nous opérons exactement de la même façon que précédemment pour la clitocybine.

Préparation des dilutions de proclitocybine

Dans une cupule de verre préalablement tarée et stérilisée, nous pesons aseptiquement 0,1 g de proclitocybine. Nous dis-

solvons la prise d'essai dans 10 ml d'eau bi-distillée neutre et stérile. A l'aide de cette solution au 1/100ème, nous préparons des dilutions au 1/500ème, 1/1000ème, 1/2000ème, 1/3000ème et au 1/5000ème par mélange avec du bouillon frais et stérile jusqu'à obtention de 5 ml de préparation dans chaque tube. Nous plaçons tous les tubes pendant 24 heures à l'étuve à 37° afin de contrôler leur stérilité.

Essais proprement dits

A chaque tube contenant 5 ml de bouillon additionné de proclitocybine, nous ajoutons 0,5 ml de suspension standard de *Staphylococcus aureus* pour la première série et d' *Escherichia coli* pour la deuxième série. Nous notons à partir de quel moment a lieu le développement du germe et nous indiquons sous forme de tableau les résultats moyens de ces essais :

Temps	Témoin	Développement du Staphylococcus aureus				
		1/500	1/1000	1/2000	1/3000	1/5000
12 h	+	0	0	0	0	0
24 h	+ +	0	0	0	0	0
48 h	+ +	0	0	0	±	+
96 h	+ +	0	0	0	+	+ +

Temps	Témoin	Développement du Escherichia coli				
		$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{2000}$	$\frac{1}{3000}$	$\frac{1}{5000}$
12 h	+	0	0	0	0	$\frac{+}{-}$
24 h	+ +	0	0	0	0	+
48 h	+ +	0	0	0	$\frac{+}{-}$	+
96 h	+ +	0	0	+	+ +	+ +

Ici encore, il apparaît une action plus retardée de la proclitocybine par rapport à celle de la clitocybine ainsi qu'une activité plus intense sur le *Staphylococcus aureus* que sur l'*Escherichia coli.*

2° *Action sur le Bacile de Koch.*

a) *Mise en évidence de l'action bactériostatique en milieu solide :*

Nous préparons une gélose peptonée, glycérinée de même formule et dans les mêmes conditions que pour la clitocybine. Nous ensemençons avec la souche de B. K. préacido-résistants de Hollande. Simultanément, nous plaçons sur la gélose glycérinée un carré de papier filtre de 1 cm de côté, imprégné d'une solution au millième de proclitocybine. Après 3 jours à l'étuve à 37°, nous obtenons une zone d'inhibition de 24 mm allant jusqu'à 28 mm pour certains échantillons.

b) *Mise en évidence de l'action bactériolytique en milieu solide :*

Nous avons opéré dans les mêmes conditions qu'avec la clitocybine et, au départ, avec de la proclitocybine au millième. Nous n'avons pas obtenu d'action bactériolytique à cette dose. Avec des solutions au diximème, nous avons observé au bout de 3 jours une lyse atteignant un diamètre de 12 à 15 mm selon les échantillons. Le pouvoir bactériolytique semble donc plus faible que celui de la clitocybine.

c) *Mise en évidence de l'action bactériostatique en milieu liquide:*

Afin d'éliminer le facteur de diffusion de la proclitocybine dans les milieux solides à base de gélose, nous avons expérimenté l'action bactériostatique de la proclitocybine envers le B. K. en milieu liquide en faisant appel à la méthode au T. P. T. décrite par WINLING (62).

Préparation du milieu de culture

Nous avons utilisé le milieu au jus de pomme de terre glycériné de J. MEYER (54) que nous préparons de la façon suivante :

Nous faisons bouillir jusqu'à cuisson :

— Pommes de terre pelées et lavées	200 g
— Eau ordinaire	400 g

Nous laissons macérer pendant 4 heures, nous centrifugeons et nous décantons le liquide surnageant, nous ramenons le volume de ce liquide à 500 ml. D'autre part, nous préparons :

— Peptone	10,0 g
— Glucose	10,0 g
— Glycérophosphate de potassium	0,50 g
— Sulfate de magnésium	0,25 g
— Chlorure de sodium	0,50 g
— Extrait de viande Liebig	2,50 g
— Citrate de fer ammoniacal	0,05 g
— Glycérine	30,0 g
— Eau ordinaire	500,0 ml

Nous mélangeons le jus de pomme de terre et le bouillon glycériné. Nous ajustons le pH à 7,4 en ajoutant quelques gouttes de lessive de soude. Nous chauffons le milieu à l'autoclave à 120° pour précipiter l'albumine insoluble et les sels alcalino-terreux. Nous passons à travers un filtre spécial et nous ajustons à nouveau le pH. Nous répartissons le milieu ainsi préparé dans des tubes à hémolyse à raison de 1 ml par tube que nous stérilisons à 115° pendant 20 minutes.

Notes sur l'indicateur T. P. T.

L'indicateur d'oxydo-réduction T.P.T. est le chlorure de 2, 3, 5 - triphényltétrazolium fabriqué par Ciba à Bâle sous la dénomination de Vitastain. Ses caractéristiques essentielles résident dans le fait qu'il est coloré en rouge sous sa forme réduite et incolore sous sa forme oxydée, ce qui le différencie de la plupart des autres réactifs d'oxydo-réduction qui sont colorés sous la forme oxydée et incolores sous la forme réduite. Les microbes vivants en prolifération sont autant de cellules qui réduisent le T.P.T. en triphénylformazan rouge et insoluble dans l'eau. Nous avons utilisé cet indicateur pour suivre la lyse du B. K. en présence de doses décroissantes de proclitocybine.

Essais de dosage du pouvoir antibiotique par la méthode au T. P. T.

Le milieu que nous avons préparé comme nous l'avons indiqué ci-dessus est réparti en tubes à hémolyse et additionné de 0,05 ml d'une émulsion de B. K. souche S. A. P. C. dans du soluté physiologique stérile (émulsion obtenue en prélevant une öse de culture âgée de 48 heures et en l'émulsionnant d'une façon aussi homogène que possible dans 10 ml de soluté physiologique stérile). Les tubes ainsi ensemencés sont portés à l'étuve à 37° pendant 2 heures, puis pendant 16 heures à 24°. On dépose à la surface de chaque culture 0,05 ml de différentes dilutions de proclitocybine à tester. Chaque série d'essai est complétée par deux tubes témoins contenant 0,05 ml d'eau distillée stérile sans principes actifs. On replace tous les tubes pendant 6 heures à l'étuve à 37°. Après cet intervalle de temps, nous les retirons de l'étuve et nous ajoutons dans chaque tube une seule goutte de solution de chlorure de 2, 3, 5 - triphényltétrazolium en solution à 1 % dans l'eau bi-distillée.

Nous observons que dans les tubes où le développement du B. K. n'a pas été inhibé (tubes témoins et tubes ayant reçu une dose de proclitocybine insuffisante) le T. P. T. vire de l'incolore au rouge foncé; par contre, dans les tubes où le

développement du B. K. a été partiellement inhibé, nous constatons une coloration rose. Dans les tubes où la croissance du B. K. est arrêtée par l'antibiotique, l'indicateur reste incolore.

Pour nous rapprocher des conditions biologiques, nous avons introduit dans une série d'essais du sérum humain à raison de 10 % dans le milieu de culture afin d'étudier si l'action antimicrobienne de la proclitocybine n'était pas inhibée par celui-ci.

Résumons dans un tableau le pouvoir antibiotique de la proclitocybine en milieu liquide à l'aide de l'indicateur d'oxydo-réduction T. P. T.

Dilutions de proclitocybine	Séries normales Couleur de l'indicateur	Séries en présence de sérum Couleur de l'indicateur
1/500	incolore	incolore
1/1000	"	"
1/2000	"	"
1/3000	rose	rose
1/5000	rouge	rouge
Témoin	rouge	rouge

La proclitocybine est donc bactériostatique vis à vis du B. K. jusqu'à une dilution de 1/2000ème. Pour certains échantillons, nous avons constaté encore une activité nette au 1/3000ème. Il est intéressant de noter que le sérum humain n'inhibe pas l'action de cette substance.

C. — Toxicité et activité in vivo de la clitocybine

1° *Toxicité par ingestion.*

Le *Clitocybe gigantea* est un champignon basidiomycète

comestible souvent mangé dans le Dauphiné. Au point de vue culinaire, il est absorbé bouilli, parfois frit, et diversement apprêté. Son ingestion ne détermine dans ces conditions aucun malaise ni d'indigestion. HOLLANDE a fait absorber à un chien berger adulte 30 g par jour et durant 5 jours consécutifs, de carpophore frais de *Clitocybe gigantea* cru, haché et mélangé à partie égale avec de la viande crue hachée. L'animal n'a présenté aucun trouble apparent. Il a fait absorber à un autre chien berger adulte 100 g de carpophore crue en une seule fois : l'animal rejeta par vomissement la majeure partie du champignon ingéré, mais ne présenta pas de troubles par la suite. L'auteur a également alimenté des cobayes de 350 à 400 g avec des carpophores frais hachés, mélangé de son à la dose de 5 à 10 g par jour. Il a noté chez quelques uns de ces animaux un état de 4 jours de constipation suivis de diarrhée le cinquième, l'élimination urinaire est augmentée. Ces animaux n'ont pas montré par la suite d'autres signes d'intoxication. Il ne faut pas oublier que de nombreux constituants biologiques, entre autres la clitocybine et la proclitocybine, sont des substances thermolabiles. Il semble donc que seuls des champignons peu cuits ou crus pourraient déterminer certains effets. La poudre de mycélium de culture récemment délipidée correspondant à 50 g de mycélium frais, à la dose de 2 à 5 g par jour durant 8 jours de suite, mêlée à de la carotte ou à de la pomme pulpée, n'a pas déterminé de troubles digestifs visibles chez les cobayes.

2° *Toxicité par injection sous-cutanée.*

La macération aqueuse de 1 g de poudre sèche de mycélium de culture ou de carpophore desséché pour 10 ml d'eau bi-distillée injectée à la dose de 1 ml est très toxique et tue les cobayes en 12 à 18 heures. On observe des places nécrosées à l'endroit de l'injection.

Une dose de 10 centigrammes de clitocybine pure en injections sous-cutanées d'un demi cm^3 tue après 18 à 24 heures un cobaye de 450 à 500 g. Il n'y a pas de nécroses des tégu-

ments au point de l'injection mais un dépôt abondant de sérofibrine incolore, transparent, sans globules rouges ; pas d'hémorragie locale. A l'autopsie, les reins ne montraient pas d'état congestif ni d'hémorragie. Des doses de l'ordre de 2 à 3 centigrammes de clitocybine pure en injections sous-cutanées sont supportées par le cobaye alors que des macérations de poudre de champignons équivalentes aux mêmes doses et à des doses nettement inférieures (1000 g de mycélium frais renferme environ 0,25 g de clitocybine pure, ce qui fait 0,0025 g de clitocybine pure pour 10 g de mycélium frais, c'est-à-dire pour 1 g de poudre sèche, celle-ci se diluant dans 10 ml d'eau physiologique, cela nous donnerait, en admettant que la clitocybine s'y dissolve, une teneur de 0,25 mg) sont fortement toxiques. Des produits toxiques surajoutés à la toxicité propre de la clitocybine font ici leur effet. Il apparaît donc qu'au point de vue toxicité par injection sous-cutanée, il y a une grande différence entre l'effet de la clitocybine et l'effet des macérations de poudre de mycélium.

Localement, la clitocybine déposée sur une gerçure ou une excroissance cutanée fait exsuder rapidement une humeur aqueuse de la gerçure ou gonfler l'excroissance.

3° *Action de la clitocybine sur les cobayes tuberculisés.*

Nous reportons ici les dernières expériences que HOLLANDE a encore effectuées et qu'il a bien voulu nous autoriser à publier. Des cobayes de 350 à 400 g furent tuberculisés, puis traités par du clitocybinate de soude en injections sous-cutanées à la dose journalière de 1 centigramme pendant 30 jours. L'animal n'a montré aucune nécrose au point de l'injection, il n'y eut aucun oedème. Aucun décès ne se produisit. Une légère augmentation de poids fut notée dès le septième jour du traitement qui fut entrepris le lendemain de la tuberculisation. Il a été noté en quelques jours une forte réaction inguinale du côté de la tuberculisation, alors que les animaux témoins ne présentaient pas ce phénomène. L'hypertrophie de ces ganglions s'est poursuivie par la suite sans suppuration

Sur les frottis des lésions, de nombreux leucocytes mono et polynucléaires renfermaient en abondance des bacilles tuberculeux phagocytés en voie de digestion très avancée. Cette poussée phagocytaire intense vis-à-vis des B. K. est un phénomène remarquable qui permet non seulement, par phagocytose, l'incorporation du bacille tuberculeux dans le protoplasme des globules blancs sans que leur noyau ne subisse la dégénérescence pycnotique (une des caractéristiques du pus tuberculeux est la présence de leucocytes morts à noyau pycnotique), mais encore de constater que les B. K. virulents, contenus dans ce protoplasme se dissolvent et sont digérés. Tout se passe comme si la clitocybine in vivo diminuait ou supprimait la virulence des B. K. vis-à-vis des leucocytes de l'animal en neutralisant leurs toxines. Ceci est d'autant plus important que les toxines des B. K. tuent habituellement à distance les leucocytes avant la phagocytose lorsque ceux-ci s'approchent des B. K.

4° *Action de la clitocybine en injection intra-ganglionnaire chez le cobaye tuberculisé.*

Lorsqu'on pratique à des cobayes ainsi traités de clitocybinate de soude le quinzième jour après l'inoculation une injection intra-ganglionnaire de 1 centigramme de clitocybinate de soude dissout dans 0,10 ml de sérum physiologique, à l'autopsie pratiquée deux mois et demi après la tuberculisation, le ganglion injecté est vide et ne présente plus qu'une coque externe durcie.

Dans l'état actuel de nos connaissances sur l'activité in vivo de la clitocybine, le phénomène d'appel phagocytaire intense envers le B. K. nous paraît l'observation la plus intéressante à retenir.

D. — **Toxicité et activité in vivo de la proclitocybine**

1° *Toxicité par injections sous-cutanés.*

Nous avons injecté des doses de 0,10 g de proclitocybine par voie sous-cutanée à des cobayes. Nous avons noté qu'une

dose de 0,30 g de proclitocybine par kilo et par 24 heures n'avait aucune action sur la vie de l'animal qui n'a pas changé ses habitudes. Par contre, nous avons noté une action passagère qui s'est nettement manifestée par l'absence de défécation et par l'absence d'urine pendant au moins 4 heures qui suivent l'injection, ce qui montre que la proclitocybine ralentit le péristaltisme intestinal et inhibe passagèrement la diurèse.

2° *Essais sur l'élimination.*

L'injection sous-cutanée de proclitocybine à des doses identiques (0,30 g par kilo et par 24 heures) à des souris, compte tenu de leur poids, permet de recueillir celle-ci très rapidement dans les urines. Nous avons noté qu'une demie-heure après l'injection, les urines de souris étaient brunes et le restaient jusqu'à élimination totale du produit, c'est-à-dire pendant au moins 5 heures. Nous avons partiellement retrouvé dans ces urines l'activité antibiotique. Les urines présentaient également la réaction des pentoses, le sucre faisant partie de la molécule de proclitocybine étant en C 5, il était probable qu'il ne soit pas assimilé et il n'est donc pas surprenant que nous le trouvions dans les urines. Il semble donc que la molécule se dédouble dans le sang, la coloration brune des urines étant d'ailleurs comparable à celle qu'on peut observer lors de l'hydrolyse spontanée ou chimique de la proclitocybine conservée en solution aqueuse.

3° *Essais sur la destinée de la proclitocybine dans le sang.*

Nous avons injecté par voie sous-cutanée 0,5 ml d'une solution au centième à 6 souris. Toutes les demie-heures, nous avons recueilli le sang au cœur de la souris et nous avons procédé avec le sang total à des mesures d'activité antimicrobienne en milieu solide sur le *Staphylococcus aureus* selon la technique décrite au paragraphe A de ce même chapitre. Nous avons constaté que l'activité antimicrobienne est nettement décelable entre 1 h 30 et 4 h 30 qui suivent l'injection

avec un maximum vers 2 h 30 et une disparition de l'activité antibiotique après 5 h 30. La proclitocybine s'élimine donc assez rapidement tout en restant assez longtemps dans le sang pour produire son action. Les mêmes essais en milieu liquide nous ont donné des résultats comparables.

Nous nous proposons d'effectuer des essais de toxicité plus complets avec un nombre plus élevé d'animaux.

Des essais de traitement de cobayes tuberculisés sont en cours et feront l'objet d'une communication ultérieure.

Dès maintenant, nous pouvons affirmer que la proclitocybine se dédouble dans le milieu intérieur avec une efficacité maximum entre la deuxième et la troisième heure après l'injection.

E. — **Action de la proclitocybine sur la croissance somatique et les tumeurs colchiciniques du blé**

1° *Rappel de quelques notions théoriques sur la colchicine.*

La colchicine est l'alcaloïde extrait des semences du *Colchicum autumnale L.* En dehors de ses usages thérapeutiques, elle a été utilisée par de nombreux expérimentateurs comme antimitotique. Elle se comporte comme un poison spécifique de la caryocinèse. Elle empêche l'augmentation de la viscosité du protoplasme dans le stade qui précède la mitose. Elle n'arrête en aucune manière les processus prophasiques, y compris le clivage des chromosomes, mais inhibe la formation du fuseau et empêche ainsi le groupement des chromosomes clivés en plaques équatoriales et leur dissociation anaphasique en deux groupes égaux. Les chromosomes restent groupés en un seul amas à partir duquel se constitue un noyau contenant un nombre de chromosomes double de celui qui caractérise l'espèce. Ce noyau anormal entrera lui-même ensuite en prophase : les chromosomes doublés reparaissent, se clivent, restent groupés et forment un nouveau noyau

contenant quatre fois plus de chromosomes qu'à l'état normal; et ainsi de suite jusqu'à la constitution dans certains cas de noyaux gigantesques contenant seize fois (4 mitoses successives), trente deux fois (5 mitoses successives), soixante quatre (6 mitoses successives) fois plus de chromosomes que les noyaux normaux. Ces faits peuvent servir de base à des travaux sur le cancer.

En traitant par des solutions très diluées de colchicine des jeunes plantes ou des grains de blé en germination, on peut obtenir dans des conditions bien déterminées leur développement en organismes tétraploïdes. Sous l'influence de la colchicine, un certain nombre de mitoses commencées sont bloquées et aboutissent à la formation de noyaux tétraploïdes qui, après cessation du traitement par la colchicine, peuvent se diviser normalement, et s'ils sont nombreux dans un mérystème, l'organisme résultant de la prolifération de ce dernier peut être entièrement tétraploïde et par conséquent, présenter un certain gigantisme et des tumeurs globuleuses (46).

2° *Expériences.*

Nous garnissons le fond de boîtes de Pétri de grains de blé déposés sur un papier filtre humecté périodiquement de diverses substances : eau, solutions de colchicine, solutions de proclitocybine.

Nous prenons :

1° une boîte humectée uniquement d'eau distillée ;

2° une boîte humectée uniquement d'une solution de proclitocybine à 10 U/ml (1 U = 0,1 mg de proclitocybine) ;

3° une boîte humectée en quantité égale de solutions de colchicine à 0,5 pour 1000 et de proclitocybine à 10 U/ml ;

4° une boîte humecté uniquement d'une solution de colchicine à 0,5 pour 1000.

Au bout de quelques jours de culture, nous évaluons dans chaque boîte de Pétri :

— le nombre de grains qui ont germé,
— le nombre total de racines,
— la longueur moyenne des racines,
— la longueur moyenne des tiges,
— le nombre de tumeurs de tige,
— le nombre de tumeurs de racine.

Nous résumons ces essais dans le tableau suivant :

Lots	Nombre de grains qui ont germé			
	4e jour	5e jour	6e jour	8e jour
1 Témoin eau	5	13	15	19
2 Proclit. 10 U	5	11	14	17
3 Proclit. 10 U Colch. 0,5 °/00	10	15	20	20
4 Colch. 0,5 °/00	18	20	25	25

Il résulte de ces observations que par rapport au « témoin eau », la proclitocybine a une action freinatrice sur la germination des grains de blé ; la colchicine a une action accélératrice sur cette germination ; l'action de la colchicine est freinée en présence de proclitocybine ; la proclitocybine seule est moins freinatrice que lorsqu'elle est additionnée de colchicine.

Lots	Nbre de racines					Long. moyenne des racines en cm					Nbre de tumeurs de racine				
	4 j.	5 j.	6 j.	8 j.	11 j.	4 j.	5 j.	6 j.	8 j.	11 j.	4 j.	5 j.	6 j.	8 j.	11 j.
1	0	0	0	8	22	0	0	0	0,2	0,3	0	0	0	0	0
2	0	0	1	6	6	0	0	0,2	0,3	0,3	0	0	0	0	0
3	0	0	20	22	22	0	0	0,1	0,2	0,2	0	0	0	1	3
4	0	12	61	65	70	0	0,6	1,5	2,5	2,8	0	0	22	25	25

Lots	Longueur moyenne des tiges en cm					Nombre de tumeurs de tige				
	4 j.	5 j.	6 j.	8 j.	11 j.	4 j.	5 j.	6 j.	8 j.	11 j
1	0	0	0	0,1	0,3	0	0	0	0	0
2	0	0	0,2	0,2	0,5	0	0	0	0	0
3	0	0	0,2	0,3	0,3	0	0	0	3	3
4	0	0,2	0,5	1,5	2	0	0	6	19	19

Il résulte de ces expériences que la taille des tiges et des racines ainsi que le nombre des tumeurs sont bien plus importants pour le lot additionné de colchicine seule que pour le lot additionné de colchicine et de proclitocybine. La proclitocybine inhibe donc l'apparition des tumeurs et par conséquent l'action tumorale de la colchicine. La proclitocybine seule ne possède aucune action tumorale, mais bien au contraire une action freinatrice sur l'apparition des racines et des tiges lors du phénomène de germination des grains de blé. Ces observations que nous considérons d'une grande importance mériteraient d'être approfondies par des essais plus

détaillés et sont susceptibles de présenter un intérêt certain dans l'étude des phénomènes de cancérisation et de leur inhibition.

Dans l'état actuel de nos recherches la proclitocybine, déjà considérée comme un antibiotique polyvalent, nous apparaît aussi comme un agent antiblastique possédant une action nette sur les manifestations physiologiques et pathologiques de la croissance.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

En définitive, nous pouvons dégager de notre travail les résultats suivants :

1° Nous avons amélioré la culture au laboratoire du mycélium de sporée de *Clitocybe gigantea* en vue de l'extraction de ses principes antibiotiques. Nous avons fait des observations complémentaires en ce qui concerne l'élaboration par le mycélium de culture des principes antibiotiques et la production d'acide cyanhydrique.

2° En partant de l'hypothèse que la clitocybine devait préexister dans les cellules mycéliennes sous une forme différente de la substance isolée initialement par HOLLANDE, nous avons élaboré une nouvelle technique d'extraction qui nous a permis l'isolement d'une nouvelle substance de nature hétérosidique : *la proclitocybine.*

3° L'analyse chimique des deux substances est rendue difficile par leur extrême labilité, labilité qui ne nous a malheureusement pas permis la détermination des structures chimiques que nous aurions voulu faire. Cependant, il apparaît des maintenant que la proclitocybine est un hétéroside renfermant en dehors de C, H, O, de l'N et du S, qui par hydrolyse libère un pentose (dont le R. F. chromatographique ne correspond à aucun R. F. de pentose connu) et une aglucone dont les propriétés sont comparables à celles de la clitocybine de HOLLANDE. Nous avons élaboré une réaction d'identité qui nous paraît spécifique de la proclitocybine et nous avons mis au point un dosage iodométrique de cette substance.

4° Nous avons effectué des essais de stabilisation de la proclitocybine et par l'adjonction de systèmes antioxydants, nous avons pu obtenir une stabilisation suffisante qui nous a permis d'effectuer des essais biologiques.

5° Une étude comparative de l'activité antibiotique des deux substances nous a permis de montrer que leurs activités antimicrobiennes sont superposables avec la différence fondamentale que l'action de la proclitocybine est à la fois moins immédiate, plus progressive et de plus longue durée que celle de la clitocybine.

6° La proclitocybine que notre technique d'extraction nous permet d'obtenir débarrassée des pigments est peu toxique, son activité antimicrobienne n'est pas détruite dans l'organisme animal, son élimination par la voie rénale est rapide et totale de sorte qu'elle ne s'accumule pas dans l'économie.

7° Enfin, nous avons mis en évidence l'action antimitotique de la proclitocybine sur la croissance physiologique et pathologique du blé, ce matériel végétal permettant d'obtenir des informations qu'il est impossible d'étudier chez les bactéries. Ces expériences mériteraient d'être approfondies en vue de faire l'étude du mécanisme biochimique de l'action de la proclitocybine et en vue d'éventuelles recherches sur le cancer.

Nous espérons avoir apporté par ce travail, poursuivi pendant plusieurs années, une contribution utile à l'étude du *Clitocybe gigantea* et de ses principes antibiotiques et d'avoir ouvert la voie à des recherches ultérieures sur ce sujet.

BIBLIOGRAPHIE

1) ANCHEL (M.), Chemical studies with pleuromutilin. *J. biol. Chem.*, 1952, **199**, 133-139.

2) ANCHEL (M.), Identification of an antibiotic polyacetylene from *Clitocybe diatreta* as a suberamic acid enediyne. *J. amer, chem. Soc.*, 1953, **75**, 4621-4622.

3) ANCHEL (M.), Some naturally occuring antibiotics polyacetylenes. *Trans. New-York* Acad. Sci., 1954, **16**, 337-342.

4) ANCHEL (M.), Structure of diatretyne 2, an antibiotic polyacetylenic nitrile from *Clitocybe diatreta. Science, U. S. A.*, 1955, **121**, 607-608.

5) ANCHEL COHEN (M. P.), Biformin. I. Its caracterization as a polyacetylenic 9-carbon glycol. *J. biol. Chem.*, 1954, **208**, 319-326.

6) ANCHEL HERVEY (A.), KAVANAGH (F.), POLATNICK (J.), ROBBINS (W. J.), Antibiotic substances from Basidiomycetes. III. *Coprinus similis and Lentinus degener. Proc. nat. Acad. Sc. U. S. A.*, 1948, **34**, 498-502.

7) ANCHEL (M.), HERVEY (A.), ROBBINS (W. J.), Antibiotic substances from Basidiomycetes. VII. *Clitocybe illudens. Proc. nat. Acad. Sc. U. S. A.*, 1950, **36**, 300-305.

8) ANCHEL (M.), HERVEY (A.), ROBBINS (W. J.), Antibiotic substances from Basidiomycetes. X. *Fomes juniperinus. Proc. nat. Acad. Sc. U.S.A.*, 1952, **38**, 655-659.

9) ATKINSON (N.), Psalliotin, the antibiotic of *Psalliota xanthoderma. Nature*, 1954, **174**, 598.

10) ATKINSON (N.), Antibacterial activity in members of the higher fungi. II. Psalliotine the antibiotic of *Psalliota xanthoderma. Austral. J. exp. Biol. med. Sci.*, 1955, **33**, 237-242.

11) ATKINSON (N.), Antibacterial activity in members of the higher fungi. III. Antibacteria and antiphage tests with psalliotin. *Austral. J. exp. Biol. med. Sci.*, 1955, **33**, 381-390.

12) BENDZ (G.), An antibiotic agent from *Marasmius graminum. Acta chem. Scand.*, 1948, **2**, 192, 6-methyl 1-4 naphtoquinone produce by *Marasmius graminum. Acta chem. Scand.*, **5**, 489-490.

13) BENDZ (G.), WALLMARK (G.), OBLOM (K.) The antibiotic agent from *Marasmius ramealis, Nature*, 1948, **162**, 61-62.

14) BOSE (S. R.), Antibacterial actions of « Polyporin » against typhoid, cholera, dysentery and B. Coli. *Nature* 1945, **156**, 171.

15) BOSE (S. R.), Antibiotics in a *Polyporus (Polystictus sanguineus). Nature*, 1946, **158**, 292-296.

16) CLAUSEN et collaborat. — *Jour, Am. Oil Chem. Soc.* - 1947, **24**, 403.

17) BOURQUELOT (E.). Les ferments solubles (diastases, enzymes), 1896, Soc. d'éditions scientifiques, Paris 220 pp.

18) BU'LOCK (J. D.), JONES (E. R. H.), MANSFIELD (G. H.), THOMPSON (J. W.), WHITING (M. C.), The structure of two polyacetylenic antibiotics. *Chem. Industr.* 1954, 990-991.

19) BU'LOCK (J. D.), LEADBEATER (E. F.), Production of polyacetylenic compouds by Basidiomycetes : glucose inversion. *Biochem. J.*, 1956, **62**, 476-480.

20) CODEX MEDICAMENTARIUS GALLICUS, 7e édition, Paris, 1949.

21) DOLDER — Stabilisation oxydations empfindlicher Arzneistoffe als Redoxsystème, *Thèse Institut de Pharmacie Zurich* - 1950.

22) DUQUÉNOIS (P.). Regards sur les antibiotiques tirés des végétaux supérieurs. Actualités pharmacologiques, *8e série*, Masson, Paris, 1955, 57-86.

23) DUQUÉNOIS (P.). Les antibiotiques des plantes supérieures. Bull. Soc. bot. Fr., 1955, **102**, 377-405.

24) DUQUÉNOIS (P.), SCHÆLDERLÉ (D.), Revue complémentaire sur les antibiotiques des plantes supérieures *Bull. Soc. bot. Fr.*, 1958, **105**, 526-560.

25) FRAGNER (P.) A new antibacterial substance from *Inoloma traganum* (inolomin). *Experientia*, 1949, **5**, 167.

26) HEIM (R.) Remarque sur la Note de M. LOCQUIN, C. R. Ac. Sc., 1947, **225**, 894-895.

27) HEJTMANKOVA - UHROVA (N.), MARTINEC (Th.). Antibiotické ucinky hlivy zkomolené *(Pleurotus mutilus Fries). Public. Fac. Sci. Univ. Mazaryk. Tchécosl.*, 1956, 378.

28) HENNIG (B.). Antibiotische Wirkstoffe in höheren Pilzen. Schweiz. Z. Pilzk, 1954, **32**, 140-144.

29) HOLLANDE (A. C.), Lyse massive des bacilles de Koch chez le cobaye après traitement à la clitocybine. Pouvoir inhibiteur de ce produit vis-à-vis du bacille typhique, du colibacille, de Brucella abortus etc..., *C. R. Ac. Sc.*, 1945, **221**, 361-363.

30) HOLLANDE (A. C.), MÉTROD (G.). Les champignons à clitocybine et les champignons leur ressemblant. Imprimerie des « Dernières Nouvelles » de Strasbourg-Montpellier, 1946, 13 pages, 5 planches.

31) HOLLANDE (A. C.). La bactériostase et la bactériolyse du bacille tuberculeux par la clitocybine *C. R. Ac. Sc.*, 1947, **224**, 1534-1535.

32) HOLLANDE (A. C.). A propos de la clitocybine cristallisée, *C. R. Ac. Sc.*, 1949, **228**, 1758-1760.

33) HOLLANDE (A. C.). Remarques au sujet de la clitocybine. *Trav. Soc. Pharm.* Montpellier, 1954, **14**, 45-47, 86-88, 89-91, 92-95.

34) KARRER (P.), RUCKSTUHL (H.), ZBONDEN (E.). Über Lactaroviolin, einem Farbstoff aus *Lactarius deliciosus*. *Helv. Chim. Acta*, 1945, **28**, 1176-1180.

35) KAVANAGH (F.), HERVEY (A.), ROBBINS (W. J.). Antibiotic substances Basidiomycetes. IV. *Marasmius conigenus. Proc. nat. Acad. Sc. U. S. A.*, 1949, **35**, 343-349 ; V. *Poria corticola, P. tenuis* and an unidentified Basidiomycete, d°, 1950, **36**, 1-7 ; VI. *Agrocybe dura*, 1950, **36**, 102-106 ; VIII. *Pleurotus mutilus* and *Pl.* passeckerianus, d°, 1951, **37**, 570-574 ; IX. *Drosophila subatrata*, d°, 1952, **38**, 555-560.

36) LOCQUIN (M.). A propos de la clitocybine, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1947, **29**, 856.

37) LOCQUIN (M.). L'action de la clitocybine est-elle due à l'acide cyanhydrique ? *C. R. Ac. Sc.* 1947, **225**, 893-894.

38) LOFGREN (N.), LUNING (B.), HEDSTROM (H.). The isolation of nebularine and the determination of its structure. *Acta Chem. Scand.*, 1954, **8**, 670-680.

39) LOFGREN (N.), TAKMAN (B.), HEDSTROM (H.). An antibiotic from *Agaricus — (Clitocybe)* nebularis Batsch, active against Mycobacteria. *Svensk Farmaceut. Tidskrift*, 1949, **53**, 321-323.

40) ODDOUX (L.). Recherches sur les mycéliums secondaires des Homobasidiés en culture pure. Morphologie, cytologie, exigences alimentaires. *Thèse Doct. Sc. (Etat)*, Lyon 1955.

41) ODDOUX (L.). Influence de l'agitation du milieu de culture sur la formation de substances antibiotiques par le mycélium de divers Homobasidiés. *Lyon Pharm.* 1956, n° 7 183-190.

42) ODDOUX (L.). Procédé d'obtention, au laboratoire, de liquides renfermant les substances antibiotiques produites par les mycéliums des Homobasidiés. *Bull. Trav. Soc. Pharm. Lyon*, 1957, **1**, 83-88.

43) ODDOUX (L.). Activité antibiotique des mycéliums d'Homobasidiés en culture pure. *Thèse, Doct. Univ. (-Pharm)*, Lyon, 1958, dactyl.

44) PRIVETT et QUACKENBUSH — Journ. Am Oil Chem. Soc. — 1954, **31**, 321.

45) REBERT (A. F.). Recherches sur la clitocybine contenue dans les carpophores du *Clitocybe candida*. Thèse Doct. Univ. (Pharm), Montpellier, 1949.

46) REBERT (A. F.), HAVAS (J.). — Action de l'abiotique *Penitaline* sur les tumeurs colchiciniques et sur la croissance somatique du blé. *Acta Inter. Cancer*, 1951, **3**, 515-517.

47) REBERT (A.F.), RINGENBACH (J. C.), HOLLANDE (A. Ch.), Isolement d'un hétéroside du mycélium de *Clitocybe gigantea*. *Trav. Soc. Pharm. Montpellier*, 1956, **16**, 161-163.

48) RIEMENSCHNEIDER — Journ. Am. Oil Chem. Soc. — 1954, **31**, 518.

49) RIVIÈRE (Ch.), THELY (M.), GAUTRON (G.). Contribution à l'étude des principes antibiotiques extraits du *Clitocybe candida, Clitocybine*. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1947, **29**, 857.

50) RIVIÈRE (Ch.), THELY (M.), GAUTRON (G.). L'action de la clitocybine est-elle due à l'acide cyanhydrique ? Bull. Soc. Chim. biol., 1947, **29**, 861.

51) RIVIÈRE (Ch.), SALOMON (L.), GAUTRON (G.). Etude des propriétés bactériostatiques de la clitocybine. Ann. Inst. Pasteur, 1949, **74**, 118-123.

52) ROBBINS (W. J.), KAVANAGH (F.), HERVEY (A.). Antibiotic substances from Basidiomycetes. I. *Pleurotus griseus. Proc. nation. Acad. Sci. U. S. A.*, 1947, **33**, 171-176. II. *Polyporus biformis*, d°, 176-182.

53) ROUX (A.), SEIGNEURIN (R.). Recherche des substances antibiotiques élaborées par les champignons supérieurs. *Lyon Pharm.*, 1956, n° 11/12.

54) SARTORY (A.), SARTORY (R.), MEYER (J.). Microbiologie Pratique - Maloine 1950, 212-213.

55) SCHMITT (J. M.), ODDOUX (L.). Activité antibiotique de cultures d'Homobasidiomycètes vis-à-vis de diverses Bactéries, Champignons et Protozoaires. *Ann. Pharm. franç.*, 1956, **14**, 20-25.

56) VALTEIGH et collaborat. — *Food-Technol.* 1954, **8**, 6.

57) VIGNERON — Autoxydation et mesures de prévention. *Soc. d'Ed. Pharm. et Scient.* 1956, page 55

58) WAKSMAN (S. A.). Antagonismes microbiens et substances antibiotiques, Trad. j. Duché de la 2e édit., Sedes, Paris, 1948, Microbial antagonisms and antibiotic substances, 1945, N. Y. lst. 2dit., the Commonwealth fund, 350 pp.

59) WAKSMAN (S. A.). The role of antibiotics in natural processes. Ier symposium euopéen sur la biochimie dans antibiotiques, Milan, 1956, Giorn, di Microbiologia, 1956, **2**, 1-14.

60) WATTS — Journ. Am Oil Chem. Soc. 1950, **25**, 48.

61) WENGER — Mitteil. Lebensmittel. Hyg. 1954, **45**, 364.

62) WINLING (E.). Etudes biologiques des Bacilles acido-alcoolo-résistants. Emploi d'un nouvel indicateur de réduction, le chlorure 2, 3, 5. — Triphényltétrazole *Thèse Doct. Univ. — (Pharm) Strasbourg,* 1953.

Vu, Strasbourg, le 21 Juin 1962
Le Président du Jury :
P. DUQUÉNOIS

Vu et approuvé :
Strasbourg, le 22 Juin 1962
Le Doyen de la Faculté de Pharmacie :
G. GAZET DU CHATELIER

Vu et permis d'imprimer :
Strasbourg, le 23 Juin 1962.
Le Recteur de l'Académie
Président du Conseil de l'Université :
J. F. ANGELLOZ.

TABLE DES MATIÈRES

Avant-Propos 9
Plan 11

CHAPITRE PREMIER

Les antibiotiques des champignons supérieurs 13

Extension de la notion d'antibiotiques 13
Les principales espèces testées 13
Nature chimique des principes isolés 17
Intérêt biologique de ces antibiotiques 19

CHAPITRE II

Étude mycologique de l'espèce Clitocybe gigantea 21

Rappel de la classification des champignons 21
Description du Genre Clitocybe et de ses espèces 23
Description de l'espèce Clitocybe gigantea 25
Description des champignons que l'on peut confondre avec le Clitocybe 27

CHAPITRE III

Culture au Laboratoire du Mycélium de sporée du Clitocybe gigantea 31

Récolte et conservation des carpophores 32
Isolement et contrôle mycologique des spores 32
Mise en culture des spores et sélection des mycéliums 33
Repiquage des colonies de mycélium sur milieux spéciaux 35
Amélioration de cette technique de culture 37
Observations concernant les conditions de culture 38

CHAPITRE IV

Extraction des principes actifs du mycélium de culture 41

Extraction de la clitocybine de Hollande 42
Nouvelles données sur l'extraction des principes actifs 46
Isolement d'une nouvelle substance : la proclitocybine 48

CHAPITRE V

Propriétés physico-chimiques des principes actifs 51

Rappel des propriétés de la clitocybine de Hollande 51
Nouvelles observations chimiques sur la clitocybine 54
Stabilité de la clitocybine 55
Propriétés de la proclitocybine 56
Réactions colorées, et essai de dosage par voie chimique 59
Essais de stabilisation de la proclitocybine 63

CHAPITRE VI

Propriétés biologiques des principes isolés du Clitocybe gigantea 72

Activité antibiotique in vitro de la clitocybine 72
Activité antibiotique in vitro de la proclitocybine 78
Toxicité et activité in vivo de la clitocybine 83
Toxicité et activité in vivo de la proclitocybine 86
Action antiblastique de la proclitocybine 88
Conclusions générales 93
Bibliographie 95
Table des Matières 103

IMPRIMÉ EN FRANCE

Dépôt légal 3e trimestre 1962 — No d'impr. 8971 - Imprimerie Alsatia Mulhouse